



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b>  <b>G01B 9/02</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 97/21979</b>  <b>(43) International Publication Date:</b> 19 June 1997 (19.06.97)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US96/20024  <b>(22) International Filing Date:</b> 10 December 1996 (10.12.96)  <b>(30) Priority Data:</b> 08/571,047                      12 December 1995 (12.12.95)      US  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> SPECTRAL DIAGNOSTIC LTD. [IL/IL]; P.O. Box 101, 10551 Migdal Haemek (IL).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> GARINI, Yuval [IL/IL]; 20126 Mizpe Koranit (IL). KATZIR, Nir [IL/IL]; 3 Hagalil, 23800 Givat Elah (IL). SOENKSEN, Dirk, G. [US/US]; 3639 Cheshire, Carlsbad, CA 92008 (US). CABIB, Dario [IL/IL]; 7 Habrosh, 23840 Timrat (IL). BUCKWALD, Robert, A. [US/IL]; Hadagan Street, 30095 Ramat Yishai (IL). MALIK, Zvi [IL/IL]; 38955 Kfar Haroe (IL).  <b>(74) Agent:</b> FRIEDMAN, Mark, M.; c/o Sheinbein, Robert, 2940 Birchtree Lane, Silver Spring, MD 20906 (US).		<b>(81) Designated States:</b> IL, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>
<b>(54) Title:</b> SPECTRAL BIO-IMAGING METHODS FOR BIOLOGICAL RESEARCH, MEDICAL DIAGNOSTICS AND THERAPY  <b>(57) Abstract</b>  Spectral imaging methods (fig. 2) for biological research, medical diagnostics and therapy to be used to detect spatial organization and to quantify cellular (fig. 5) and tissue natural constituents, structures, organelles and administered components such as tagging probes (fig. 27) and drugs using light transmission (fig. 9), reflection, scattering and fluorescence emission strategies (fig. 7), with high sensitivity and high spatial and spectral resolutions.		

5

(19)日本国特許 (12) 特 許 公 報 (13) 特許番号

特許第3280035号  
(P3280035)

(45)発行日 平成14年4月30日(2002.4.30)

(24)登録日 平成14年2月22日(2002.2.22)

(5)InCl:		F1	
G01J	3/6	G01J	3/6
A61B	3/00	A61B	3/00
5/12		5/00	101A
5/00	101	10/00	E
10/00		G01B	11/00
		請求項の数(全57頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号		(23)特許権者	
特願平9-522259		NEOS6692	
(22)出願日 平成8年12月10日(1996.12.10)		スベトラル ダイナミクスインク リミテッド イヌエルロ、ミカエル ハエマ 1055、ビョーボックス 101 ユル、ガリニ イヌエルロ、ミッペ コラニ 2026 (22)発明者 ニル カチール イヌエルロ、ギバト エラー 23900、 ハザリル 3 (23)優先権主張国 米国 (U.S.) (24)代理人 伊東正 中村 勉 (U9名) 審査官 樋口 宗彦	
(25)公開番号		特開平9-522259	
(26)公開日 平成9年11月19日(1999.11.19)		イヌエルロ、ミカエル ハエマ 1055、ビョーボックス 101 ユル、ガリニ イヌエルロ、ミッペ コラニ 2026 (27)発明者 ニル カチール イヌエルロ、ギバト エラー 23900、 ハザリル 3 (28)優先権主張国 米国 (U.S.) (29)代理人 伊東正 中村 勉 (U9名) 審査官 樋口 宗彦	

最終頁に続く

(57) 特許請求の範囲

【請求項1】 高い空間およびベンツル解像度と特徴とする分光生物画像方法であって、

(a) 分光画像されるべきサンプルを調製し、  
(b) そのサンプルを連続分光計に光学的に結合された光学装置を通して観察することにより、

(i) コリメートされた入射光を多数の要素を有する干渉計系に通過し、光を干渉計内部で異なる方向に進行する2つのコヒーレント光線に分割し、次いで2つのコヒーレント光線を再結合して互いに干渉させ、出射光線

を形成するようにし、  
(iii) 出射光線を合焦光学系に通過し、検出器要素の2次元アレイを有する検出器上に出力光線を合焦させ、

形成し、

(c) 数値アルゴリズムを用いて第1のスベツトルキエーンを探索する工程を含むことを特徴とする分光生物画像方法

【請求項2】 (d) 探索されたデータのスケツトルキエーンをマッピングする工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項3】 前記光学装置は、顕微鏡、カメラレンズ、内視鏡、眼底カメラおよび眼底鏡からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項4】 前記顕微鏡は、反射顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、直立(倒置)顕微鏡、倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、コンフォーカル顕微鏡、定在波コンフォーカル顕微鏡および反コンフォーカル顕微鏡からなるグループから選択されることを特徴とする請求項3に記載の方法、

【請求項5】 前記平行光は、サンプルからの透過光、サンプルからの反射光、サンプルからの散乱光およびサンプルからの発光からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項6】 前記サンプルからの前記発光は、発光アローフ蛍光、発光アローフ励起光および自己蛍光の方法、

【請求項7】 光源から生成される前記光は、レーザー、白色光、フイルター透過光、紫外光および広帯域光源の光のグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項8】 前記光は複数の光源から生成され、これら光源は同時に作動されることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項9】 前記光は複数の光源から生成され、これら光源は順次作動されることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項10】 前記2次元アレイは、ビデオレートCCD、希薄高ダイナミレンジCCD、増感CCDもしくは時間ゲート増感CCDのようなCCD、

前記光は複数の光源から生成され、これら光源は同時に作動されることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項11】 前記サンプルは細胞、組織および微生物からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項12】 前記細胞および組織は人体から採取されることを特徴とする請求項11に記載の方法、

【請求項13】 前記細胞は、例えば、Pop染色により染められた細胞、血液細胞、胎児細胞、悪性腫瘍の疑いの細胞、分裂休止期の細胞、有糸分裂中細胞および還元分裂中細胞であることを特徴とする請求項11に記載の方法、

【請求項14】 前記組織は、脳膜、網膜血管、角膜、皮膚、角膜、髪、肺、胃、腸、膀胱、結膜、前立腺、動脈、

脈、腎臓および心臓からなるグループから選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法、

【請求項15】 前記サンプルが組織であり、前記方法が、組織血管における動脈および静脈化ヘモグロビンの検出であることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項16】 前記サンプルが組織であり、前記方法が、組織のメラニン色素または着いべんの検出であることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項17】 前記サンプルが細胞、組織の一部および微生物からなるグループから選択され、前記光がアローフにより励起され、このアローフは特定の細胞成分に結合され、前記方法は細胞成分の存在もしくはそのレベルの検出であることを特徴とする請求項1に記載の方法、

【請求項18】 前記アローフは共役蛍光部分を含む、前記励起が蛍光部分の蛍光発光であることを特徴とする請求項17に記載の方法、

【請求項19】 前記アローフがさらに被検分子を含む、前記方法がこの被検分子を分配する細胞成分の存在もしくはそのレベルの検出であることを特徴とする請求項18に記載の方法、

【請求項20】 前記細胞成分がデオキシリボ核酸およびリボ核酸からなるグループから選択されることを特徴とする請求項19に記載の方法、

【請求項21】 前記アローフが抗体を含む、前記方法が、この抗体により認識される細胞蛋白質の存在もしくはそのレベルの検出であることを特徴とする請求項17に記載の方法、

【請求項22】 前記蛍光部分が、SpectrumOrange<sup>®</sup>、SpectrumGreen<sup>®</sup>、Aqua Texas-Red、FITC、ローダミン、フルオレセイン、カスケードブルーおよびこれらの組み合わせからなるグループから選択されることを特徴とする請求項21に記載の方法、

【請求項23】 前記数値アルゴリズムが、サンプルの各ピクセルのスベツトルのポイントオブビューン解析であることを特徴とする請求項22に記載の方法、

【請求項24】 前記ポイントオブビューン解析が、サンプルにおける各ピクセルのスベツトルを変形関数に基づいて別のスベツトルにマッピングすることを含むことを特徴とする請求項23に記載の方法、

【請求項25】 前記数値アルゴリズムが、形態学解析であることを特徴とする請求項24に記載の方法、

【請求項26】 前記数値アルゴリズムが、形態学解析であることを特徴とする請求項25に記載の方法、

【請求項27】 前記数値アルゴリズムが、形態学解析であることを特徴とする請求項26に記載の方法、

【請求項28】 前記数値アルゴリズムが、形態学解析であることを特徴とする請求項27に記載の方法、

【請求項29】 前記数値アルゴリズムが、形態学解析であることを特徴とする請求項28に記載の方法、

【請求項30】 前記数値アルゴリズムが、形態学解析であることを特徴とする請求項29に記載の方法、

【請求項28】 前記類似サブピクセル解析がグレイレベルもしくは類似カラーイメージを作りだし、明いピクセルが小さなサブピクセル差に対応し、暗いピクセルが大きなサブピクセル差に対応することを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項29】 前記類似サブピクセル解析がグレイレベルもしくは類似カラーイメージを作りだし、ここでは明いピクセルが大きなサブピクセル差に対応し、暗いピクセルが小さなサブピクセル差に対応することを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項30】 前記サブピクセル差が、各ピクセルのサブピクセルと参照サブピクセルとの差の絶対値を所定変長レンジにおいて積分して定義されるスカラーであることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項31】 前記数学的アルゴリズムが類似サブピクセル解析であり、これにより、各ピクセルのサブピクセルにおけるいくつかの参照サブピクセルからのサブピクセル差を計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項32】 前記積分サブピクセル解析が類似カラーイメージを作りだし、このイメージにおいていくつかの参照サブピクセルの一つに対して所定最大サブピクセル差を有する一群のピクセルが所定類似カラーにより着色されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項33】 前記サブピクセル差が、各ピクセルのサブピクセルと前記いくつかの参照サブピクセルの一つとの差の絶対値を所定変長レンジにおいて積分して定義されるスカラーであることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項34】 前記数学的アルゴリズムが主要コンポーネント解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項35】 前記主要コンポーネント解析が、  
(a) 全測定ピクセルおよび変長、なお、変長変長が用いられるときには助変長の変長を含む、の共変マトリクスを構築し、  
(b) この共変マトリクスを対角化するとともに全直交サブピクセルベクトルを見つけたし、  
(c) このベクトルエレメントがサブピクセルの所定特徴を有するかを算出する

【請求項36】 前記数学的アルゴリズムが一次結合解析であることを特徴とする請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記一次結合解析が、前記第1のサブピクセルグループおよび前記第2のサブピクセルグループに属する一対の対応ピクセルの対応変長間隔に算術平均を適用して、第3サブピクセルグループを求めるようになっていることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項38】 前記一次結合解析は、二つのサブピクセルグループの平均変長、時間変化追跡およびサブピクセル正規化からなるグループから選択されることを特徴

とする請求項36に記載の方法。

【請求項39】 前記一次結合解析は、算術関数によって各ピクセルのサブピクセル変長全てに所定スカラーを与えるものであり、この算術関数は加算、減算、乗算、除算およびこれらの組み合わせからなるグループから選択されることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項40】 前記一次結合解析は、サブピクセルの除去に用いられ、サブピクセルのサブピクセルに位置するピクセルのサブピクセルがサブピクセルのピクセルの位置から引き去られることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項41】 前記一次結合解析が校正処理に用いられ、サブピクセル観察前に測定されたサブピクセルのサブピクセルのピクセルのサブピクセルを修正するために用いられることを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項42】 前記数学的アルゴリズムが光密度解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項43】 前記光密度解析が光密度サブピクセル変長イメージを得るためのものであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項44】 前記数学的アルゴリズムが予め設定された変長レンジを用いて対応カラーイメージを計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項45】 前記数学的アルゴリズムはピクセルのサブピクセル用の二つの異なる変長間隔の比を算出することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項46】 前記数学的アルゴリズムはピクセルのサブピクセル用の二つの異なる変長間隔の比を算出し、このように算出された比に応じて、各ピクセルの明色もしくは暗色の人口色で着色することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項47】 前記方法は、サブピクセルに与えられた多重蛍光検出体のサブピクセルを特定を行うために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項48】 前記方法は、サブピクセルにおけるミクロ的な環境変化を検出するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項49】 前記ミクロ的な環境変化は、局所的な電位、pHレベルおよび細胞間のイオン集中からなるグループから選択されることを特徴とする請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記方法は、サブピクセル内の自然成分からの自己蛍光を測定するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項51】 前記方法は、前記サブピクセルの自然成分からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項52】 前記自然成分が、葉緑素、ポルフィリンおよび細胞色素白蛋白からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項53】 前記方法は、細胞、細胞管、細胞管、皮膚、角膜、髪、鼻、腸、膀胱、結膜、前立腺、頸部、顔面、静脈、心臓および平滑肌細胞からなるグループから選択されることを特徴とする請求項51に記載の方法。

【請求項54】 前記方法は、生物学研究、薬品製造業、病理学における細胞および組織分類、血液学、尿中のケタリヤの存在解析、染色体中での遺伝子識別およびマッピング、遺伝子診断、細胞器解析および生理学、細胞におけるクロマチン分配および細胞、細胞質のマッピング、黒色腫およびほかの腫瘍、ポロイニド、および光学的治療の前、間および後の皮膚画像作成からなる用途グループから選択される用途のために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項55】 前記細胞質成分はNAD<sup>+</sup>、NADH、フラビンおよびチトクロームからなるグループから選択されることを特徴とする請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記方法は、サブピクセルにおける少なくとも二つの蛍光間の空間分離を決定する蛍光共鳴エネルギー移動を測定するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項57】 前記蛍光検出体のうち少なくとも一つはサブピクセル外部から受光されることを特徴とする請求項56に記載の方法。

【請求項58】 前記サブピクセルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサブピクセルにおける細胞および細胞レベル以下の詳細の観察およびマッピングを行うために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項59】 前記サブピクセルはRomanovsky-Giesma染色法、Heamatoxylin-Eosin染色法およびMay-Grünwald-Giesma染色法からなるグループから選択された方法により着色されることを特徴とする請求項58に記載の方法。

【請求項60】 前記細胞レベル以下の詳細は、核におけるクロマチン組織のタイプであり、このタイプは異質染色質および均質染色質からなるグループから選択されることを特徴とする請求項59に記載の方法。

【請求項61】 前記サブピクセルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサブピクセルにおける生命プロセスを時間としてモニターするために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項62】 (a) 少なくとも一つの蛍光染料を用いて少なくとも一つの細胞分子を特定し、少なくとも一つの蛍光追跡検出フローを得るマッピング、  
(b) 生物サブピクセルの細胞核と前記フローとを交配

とせるマッピング、

(c) 画像分光計に光学的に繋がった蛍光顕微鏡を通して生物サブピクセルを観察する間に、  
(1) 平行光学系を用いて生物サブピクセルの全ピクセルからの射出光を同時に集光し、

(ii) この射出平行光を複数のエレメントを有する干渉計システムを通して、干渉計内を異なる方向に運ぶ二つの干渉ビームに分類し、そして、これらの二つの干渉ビームを互いに干渉させて再結合させ干渉ビームを生成し、

(iii) この干渉ビームを合焦光学システムを通して二次元配列の射出エレメントを有する検出器に合焦させ、各時点において、前記検出器要素の各々が、測定の間隔にわたって前記サブピクセルの1つの素に同一のピクセルの像となり、

検出サブピクセルの画像が検出器アレーの面上で静止し測定の間隔にわたって画像が可視的で、かつ、識別可能な状態となるようにし、

前記検出器要素の各々によって、各時点についての光路差の関数として、異なる変長で前記ピクセルから寄せられた光の強度の特定の一次結合となる値を生成し、

(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させることによって、  
干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間の光路差を、生物サブピクセルの全ピクセルについて同時に追査

(v) 記録装置を用いて時間間隔として各射出エレメントの番号を記録して、第1サブピクセルグループを形成し、生物サブピクセルの各ピクセルのサブピクセルを得るマッピング、及び

(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1サブピクセルグループを変換するマッピング、  
【請求項63】 (a) 少なくとも一つの検出フローと生物サブピクセルの細胞核とを交配させるマッピング、  
(b) 前記少なくとも一つのフローを少なくとも一つの蛍光染料により特定するマッピング、

(c) 画像分光計に光学的に繋がった蛍光顕微鏡を通して生物サブピクセルを観察する間に、  
(i) 平行光学系を用いて生物サブピクセルの全ピクセルからの射出光を同時に集光し、

(ii) この射出平行光を複数のエレメントを有する干渉計システムを通して、干渉計内を異なる方向に運ぶ二つの干渉ビームに分類し、これらの二つの干渉ビームを互いに干渉させて再結合させ干渉ビームを生成し、

(iii) この干渉ビームを合焦光学システムを通して二次元配列の検出要素を有する検出器に合焦させ、各時点において、前記検出器要素の各々が、測定の間隔にわたって前記サブピクセルの1つの素に同一のピクセルの像となり、

探サンプルの実像が検出器アレーの面上で静止し測定  
の全期間にわたって状態が可視的で、かつ、識別可能な状態  
となるようにし、

前記検出器要素の各々によって、各時点についての光路  
差の関数として、異なる波長で前記ピクセルから発せら  
れた光の強度の特定の一衣結合となる信号を生成し、  
(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転  
させることによって、

この干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間  
の光路差を、生物サンプルの全ピクセルについて同時に  
走査し、

(v) 記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメ  
ントの信号を記録し、第1スベクトルキューデータを  
形成して、生物サンプルの各ピクセルのスベクトルを得  
るステップ、及び

(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スベクトル  
キューデータを変換するステップ、  
からなることを特徴とする分光法。

【請求項64】 前記数学的アルゴリズムが分類マップ  
ン解析であり、これにより、各ピクセルのスベクトルに  
おけるいくつかの参照スベクトルからのスベクトル差を  
計算することと特徴とする請求項62に記載の方法。

【請求項65】 前記数学的アルゴリズムが一次結合解析  
であり、背景を除去するためのものであることを特徴と  
する請求項63に記載の方法。

【請求項66】 追加の数学的アルゴリズムとしての分類  
マップン解析を用いるステップをさらに有し、この追  
加数学的アルゴリズムにより前記ピクセルのスベクト  
ルに關して、少なくとも一つの参照スベクトルとのスベ  
クトル差を計算することと特徴とする請求項65に記載の  
方法。

【請求項67】 前記分類マップン解析が、前記各ピク  
セルのスベクトルに關して、少なくとも一つの参照スベ  
クトルとのスベクトル差を計算するステップを含むこと  
と特徴とする請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記分類マップン解析が、前記各ピク  
セルのスベクトルに關して、少なくとも一つの参照スベ  
クトルとのスベクトル差を計算するステップを含むこと  
と特徴とする請求項66に記載の方法。

【請求項69】 (a) 解析用の細胞ミスを準備するス  
テップ、

(b) 検出分光計に光学的に繋がった透過顕微鏡により  
前記細胞ミスを観察する間に、

(i) 平行光学系を用いて細胞ミスの全ピクセルから  
の射出光を同時に集光し、

(ii) この射出平行光を複数の要素を有する干渉計シ  
ステムに通して、干渉計内を異なる方向に通む二つの干渉  
ビームに分離し、そして、これら二つの干渉ビームを互  
いに干渉させて再結合させ回折ビームを生成し、  
(iii) この回折ビームを合焦光学システムに通して二

次元配列の検出要素を有する検出器に合焦させ、  
各時点において、前記検出器要素の各々が、測定の全期  
間にわたって前記サンプルの1つの常に同一のピクセルの  
像となり、

該サンプルの実像が検出器アレーの面上で静止し測定  
の全期間にわたって状態が可視的で、かつ、識別可能な状態  
となるようにし、

前記検出器要素の各々によって、各時点についての光路  
差の関数として、異なる波長で前記ピクセルから発せら  
れた光の強度の特定の一衣結合となる信号を生成し、  
(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転  
させることによって、

干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間の光  
路差を、細胞ミスの全ピクセルについて同時に走査  
し、

(v) 記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメ  
ントの信号を記録して、第1スベクトルキューデータを  
形成し、細胞ミスの全ピクセルのスベクトルを得る  
ステップ、及び

(c) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スベクトル  
キューデータを変換するステップ、  
からなることを特徴とする細胞分類方法。

【発明の詳細な説明】  
発明の分野及び背景

本発明はスベクトル法に關し、さらに詳しくは、生物  
学研究、医療診断および検査用の分光画像（イメージ  
ング）法に關し、以下、この方法を分光生物画像法と称す  
る。本発明に係る方法は、空間的な構成（すなわち、分  
布）を抽出したり、細胞および組織の自然組成、構造、  
器官および同位体トレーサングロブ（例えば、蛍光ア  
ローブ）のような処理コンポーネント、並びに光透過、  
反射、散乱および強光を利用する要素等を、高い空間お  
よびスベクトル解像度で計量したりするために用いるこ  
とができる。

35 分光計は、光を受光してその成分波長に分離（分散）  
させ、波長を関数とする光の強度である光スベクトルを  
測定する装置に設計された装置である。画像（イメージ  
ング）分光計は、対象から射出される光を集めて各ピク  
セル（画素）のスベクトルを測定する装置である。

40 分光学は、化学成分の各スベクトル特性に基づいて材料  
およびプロセスを特徴付けるために、科学および産業  
野において何十年も用いられてきている周知の分析ツ  
ールである。分光学の物理的原理は、光と物質との相互作  
用である。伝統的に、分光学は、サンプルからの射出  
45 光、透過光、散乱光および反射光の強度を、波長の関数  
として、高いスベクトル解像度で、測定するものである  
が、空間的な情報がないという、

一方、高い解像度の分光学と高い解像度の画像法（す  
なわち、空間情報）との合成である分光画像（スベクト  
ル画像）法は、生物サンプルの解析には用いられていな

い。現在の所でも近いものとしては、限られたスベク  
トル情報のみを提供しつつ生物サンプルから高い空間解  
像度の情報を得る物があるだけであり、このようなもの  
の例として、一つもしくはいくつもの独立したバンドパ  
スフィルターを用いて高い空間解像度の撮像を行うもの  
がある（Andersson-Egelis等による「Proceedings of  
SPIE—Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy」  
y, 1205, pp. 179–189 (1990)」を参照。また、サンプル  
のいくつかの点もしくはサンプル全体の平均に照って高  
い空間的な解像度（例えば、全スベクトル）を得るもの  
もある（Alfano等による米国特許第4,930,516号参  
照）。

以下に詳細に説明するように、分光学と画像法とを組  
み合わせることは、様々な生物学的研究および医学的用  
途に有用である。一例を挙げれば、蛍光フローで分析  
（フロー）された後において、特定の細胞組成（例え  
ば、蛋白質、核酸配列）の抽出がある。このように分光  
画像法は、一回の測定でいくつもの蛍光体を測定し同時  
にその分布を特定するために用いることができる。其  
限、分光画像法に固有の高い解像度は、重なり合うスベ  
クトル像を有した蛍光フロー（もしくはその他の化  
学成分）を分類するのに適している。同様に、分光画像  
法は、像のどの位置であっても、サンプルの環境的な不  
均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスベクトル  
シフトの抽出も可能である。

概念の上は、分光生物画像システムは、(1) 計測シ  
ステムと、(2) 解析ソフトウェアとからなる。計測シ  
ステムは、光学および電子工学の全てを有し、サンプルの  
照明源（例えば、光源の選択）、測定モード（蛍光発  
光もしくは透過）から、測定結果から所望の結果を抽出  
するのに関連した校正までを含む。解析ソフトウェアは、  
重要な結果を有意義な方法で解析し且つ表示するために  
必要な全てのソフトウェアおよび数学的アルゴリズム  
を含む。

分光画像法は、スベクトル吸収特性を識別して、地球  
および他の惑星の内部研究を遠隔検査する分野におい  
て、何十年にわたって用いられてきている。しかしなが  
ら、遠隔検査式の分光画像システム（例えば、ランドサ  
ット、AVIRIS）は、コストが高く、大型且つ複雑な構成  
であるため、その用途は航空および衛星用に限定されて  
いる（MaymonおよびNeck (1988) による「Proceedings  
of SPIE—Recent Advances in Sensors, Radiometry and  
Data Processing for Remote Sensing」, 924, pp. 10–  
22; Dozier (1998) による「Proceedings of SPIE—Recent  
Advances in Sensors, Radiometry and Data Process  
ing for Remote Sensing」, 924, pp. 23–30等を参照されたい  
）。  
50 分光生物画像システムと見なされる三つの基本的なタ  
スクの各々には固有の利点がある。それは(i) スベクト  
ル格子法、(ii) スベクトルフィルター法および(iii)

1) 光学干渉分光法である。後述するように、光学干渉  
分光法は本発明の方法を行うのに最適である。

例えば、DILORシステム（Walsh等 (1995年9月) に  
よるthe SPIE Conference European Medical Optics No  
ok, BIOS Europe '95, スペクトルセルセラでの発表参  
照）のように、スリットタイプの検出分光計として長く  
知られている格子分光（すなわち、モノローグマー）  
に基づくシステムにおいて、CODアレー検出器の一つ  
10 の軸（空間軸）のみが実際のイメージングを提供し、  
第2軸（スベクトル軸）は、波長の関数として格子によ  
って分散される光の強度をサンプリングするために用い  
られる。このシステムはまた第1の焦点平面にスリット  
を有し、どの時間においても境界をピクセル線に限定し  
ている。このため、この方法では、入力ビームをCODの  
15 スベクトル軸に平行な方向に走査、すなわち、ライン走  
査して初めて全体像を得ることができる。全ての計測が  
完了する前には二次元イメージを得ることができないた  
め、測定前に、計測領域内で所望の領域を選択したり、  
システム焦点を最適化したリ、露出時間を最適化したリ  
20 することはできない。格子分光に基づくスベクトルイメ  
ージは遠隔計測用途では一般的に知られている。これ  
は、地球の上を飛行する航空機（もしくは衛星）は自然  
なライン走査機構システムを有するからである。

スリットタイプの検出分光計は、計測の前面が光学系に  
より全ピクセルに同時に測定される時間と同時に、一つのフ  
レーム上のピクセル間で測定される時間は同時ではないと  
いう大きな欠点を有する。このため、所定のSNRで必  
要な情報を得るには比較的に長い計測時間が必要であり、  
逆に所定時間の測定ではSNR比（感度）はそれほど低く  
30 なる。さらに、スリットタイプの検出分光計は、全面  
についての必要情報を集めるにはライン走査が必要であ  
るため、測定結果精度は低下しやすい。

フィルターを用いるスベクトル分散法はさらに、独立  
フィルターとチューナブルフィルターとに分類できる。  
これらのタイプの検出分光器においては、スベクトルイ  
メージは、光路内に集光ビームフィルターを導入し  
て、異なる波長域に、且つ各時間域に、画面内の全ピク  
セルに照射される光にフィルターをかけて画像を得た  
り、AOTもしくはLCF（下記参照）を用いて電氣的に波  
40 長域を走査して得られる。フィルターベーススベクトル  
分散法を用いても、上述した格子を用いてスリットタイ  
プの検出分光計と同様に、各時間においては照射光の大  
部分は用いられない。実際、測定される波長以外の光子  
は全てはねられてCODに到達しないので、特定の波長の  
全体像が測定できるだけである。

音響—光学チューナブルフィルター（AOTs）および  
液晶チューナブルフィルター（LCFs）のようなチュー  
ナブルフィルターは可動部品を有しておらず、これらが  
装着される装置のスベクトルレンジにおける任意の波長  
にチューンすることができ、分光画像分散法としてチ

エナプタフイルターを用いる利点の一つは、任意に波長を選択できること、すなわち、フイルターホイールを用いることなく、任意の順で多くの波長の強度分布イメージを測定できる能力である。しかしながら、AOTFを用いたCTFは、(i) スベクトルレゾリューションが限られ、例えば、 $\lambda_{\text{max}} = 2.2 \text{ nm}$ 、このレゾリューションは全て遮断されなければならない、(ii) 温度に敏感である、(iii) 透過率が低い、(iv) 偏光性がある、(v) AOTFの結合に必要する装置中にイメージント成果があるという欠点を有する。

このようなフイルムおよびビデオ・フイルム・カメラによる観察は、従来の顕微鏡観察に比べて、感度が低く、簡便性に欠け、データの記録および表示のためのソフトウェア・プログラム・システムが複雑であるため、どのような用途においても分光撮像としては長年にわたって継続して且つ広範囲にわたって用いられるものではなかった。上述のように、本稿の著明な研究者は、光子増強型分光カメラを用い、生物臨床医科学に適用される高解像度の撮像系と組み合わせた、高解像度の分光画像について述べた論文を全く発見できなかった。但し、上述したように、高解像度の撮像系と組み合わせた低解像度および低感度の分光計や、カメラの一方または双方が所定についての高解像度の分光計についてある程度研究した文献や、特許は見つかった。例えば、(1)細胞通信研究に関してRied (Jan. 1994) Fluoreszenz in situ Hybridisierung in der genetischen Diagnostik, University Heidelberg. (2) 細胞内の薬剤分布に関するMairati and Charonov (1995) Fluorescence spectral imaging: State of the art and perspectives. "A PC CYTOMETRIE '95, Reims, France, Sep. 27th - 29th, 1995"において発表、(3)組織が、投影を通してAlfano et al. (1990) Proceedings of SPIE, Bio-Imaging and Two-Dimensional Spectroscopy, 1205, pp. 179 - 189. およびFitts et al. (1995) Paper presented at European Biomedical Optics Week by SPIE, 12-16 September 1995, Barcelona, Spain. (4) 細胞レベルにおける分子の動態表示に関してRied et al. (1981) Computer Discrimination of Erythrocytic Cells, The International Academy of Cytology Analytical Cells, The International Cytology, Vol. 3, p. 225. (5) 眼科術に関してDajori (1993) Appl. Optics Vol. 27, 1113, 1988およびUphill, Optics, Vol. 28, 1061, 並びにスリットカメラおよび蛍光血管造影に関するその他の文献、例えば、Dajori et al. (1987) Vision Research, Vol. 20, 1093等がある。

⑦ しかしながら、これら文献および特許は、使用されるハードウェアという観点において本稿明とは異なる。このハードウェアとは、高い空間およびスペクトル解像度

が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および／もしくは組織レベルにおいて診療薬、研究もしくは外科医に与えるに学生産理および精製された光線である。

上記の点で使われている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1956年2月21日出願のCahill等による米国特許出願第068/392,019号に開示されている。なお、この特許出願は、画像のスペクトル解析用の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出光を集めて得られる全情報を有効に利用し、従来のスリットタイプもしくはリアルタイムの画像スペクトル計測法に比べて、フレーム時間を大きく低減しさらに／もしくは5/N比を大きく向上させ、さらにスリット走査を含まない。本発明によれば、各ビクセルのライン強度を求め、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ビクセルからの射出光のスペクトル強度を二重に集めた所定セットに対応して、調整された光を出させる干渉計を用いて、この干渉計からの光を射出部アレイの上に集め、全ビクセルについて独立して且つ同時に光干渉計において作られた光路差 (OPD) を走査後出し、検出器アレイの出力 (全ビクセルそれぞれからの干渉波) を処理して様々なタイプの干渉計を用いて実行される。この方法は様々なタイプの干渉計の一要素もしくはは、射出光の入射角を変動させてOPDを変化させて干渉波が作られる。これら全ての場合において、スキャナーク干渉計の一回の走査を完了すると、画面上全ビクセルの干渉波が完成する。

上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いて行うことにより、従来のスリットタイプもしくはリアルタイムの画像スペクトル計測法と異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットに限定したり、干渉もしくはチェンナークアレイにより装い波長域に限定したりすることができ、その結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有効に利用でき、測定時間を大幅に低減させさらに／もしくは5/N比 (すなわち、感度) を大幅に向上させる。例えば、John B. Gailman (1987) Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing, SPIE Proceedings, Vol. 750, p.140に述べられてい "nisk beam" を考えてみる。ここで、nをリアルタイムにおける検出器数とし、mをxをフレーム内のビクセル数とし、tをフレーム時間とする。一つのフレームにおける各ビクセルの使用時間を検出器アレイ全体について合計した時間は、 $nmt$ である。米国特許出願第08/392,019号に開示の発明に係る方法の場合には、同一サイズのフレーム毎のフレームワークを用いれば、特定のビクセルについて全検出器の合計使用

時間は、 $1/f$  である。しかしながら、従来の格子法においては各時間において全検出器によって見られるエネルギーは、波長範囲そのレンジの  $1/n$  である。これに対して、全エネルギー  $E$  の  $n$  のオーダーとなる。これに対して、米国特許出願第 88/392, 019 号に開示に係る方法では、ゼジュエーディング関数がラージ  $Q$  のレンジにわたる平均 50% となる変動関数 (例えば、フーリエ  $\rho$  :  $\text{Fibury-Perot}$  を有した低  $\rho$  :  $\text{Finesse}$  空間関数 (low finesse Airy function) のような  $\rho$  :  $\text{Finesse}$  (Michelson) もしくはこれと同様の周期的な関数) であるので、1 のオーダーとなる。干渉学の教科書 (例えば、Chamberlain (1979) The principles of interferometric spectroscopy, John Wiley and Sons, pp. 16-18 and p. 268参照) に述べられている Fellgett 効果 (もしくは多重効果) の概要通りに基づけば、本発明に係る装置は、ノイズレベルが信号から独立しているという  $1/n$  の不利な制限条件 (システムもしくはバックグラウンドノイズが有限である条件) においては、 $n^2$  のフクターで改善され、且つ、前記制限が信号光子ノイズにより生る場合での狭い  $n$  の波長におけるサブトルマルレンジにおいて、特定波長の信号に対する平均信号の比のことで改善されるような S/N の規定を有するということを示すことができる。このように、米国特許出願第 88/392, 019 号に開示の発明によれば、サブトルマル再帰類に必要な全情報を得るために、必要  $000$ s の全てが画像のビジュアルに取得される同時に、必要  $000$ s の全てが画像のビジュアルに取得される同時に走査され、これにより、画像の倍とともに対応トルマル情報と同時に集められ、この発明は、遠隔査察のための望遠鏡、実験室での解析用の顕微鏡、産業上でのモニタ一用の光ファイバ一および広域的な撮像、診断、治療等のような様々な光学的な構成的に用いられる。

分光生物情報システムは、普遍的に、画像中での空間分布および生成を注目すべき化学成分間で、微妙なシステム差を存在する適用例に有用である。この判別は、本質的には、特許出願第 88/392, 019 号に述べられているシステムに付属のいくつかの光学システムを用いた行なわれ、これは付属のいくつかの光学システムとしては、例えば、内視鏡、しばしば反転顕微鏡、蛍光顕微鏡、マイクロレンズ、位置決めおよび視野野、自己蛍光および投与プロローフの蛍光等を含む観察のための実験方法を用いることができる。

當該判別は、出力システムがシステム感度のサブトルマルレンジ内にあると仮定して、横断システムエネルギー (バイアスエネルギー、断絶エネルギーおよびマイクロエネルギーからなる) もしくは特殊用途用のカメラ方式を分散したエネルギーを用いて行うことができる。分散したエネルギーは、監視野および位相性とのような重要な空間エネルギー法とともに、さらには偏光顕微鏡法と法とともに用いることができる。このような方法を用いるまでのサブトルマル情報効果は、計測システム画像

を正しく変換することである。

光透過および蛍光顕微鏡検査法において、分光生物画像システム用の実験的な方法および特殊な用途はたくさんある。このような方法および用途としては、これに限られるものではないが次のようなものがある。(1) 光透過顕微鏡検査—着色組織サブゾノルの計測。(2) 蛍光顕微鏡検査：(i) 多重蛍光標送体のベクトル認識。(i) 細胞レベル以下の区画 (例えば、 $\text{pH}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ イオン集中) におけるミクロ的な環境変化および染料特性的の検出。(iii) 自然色画 (例えば、葉緑素) からの自己蛍光の計測。および (iv) 蛍光共鳴—エネルギートランスファー (FRET)。これ以外の可能性のある用例としては、(1) 時間分解イメージング画像 (運動的な部分リガーを有した格子強化COIを用いて得られる)。(2) ラマン散乱計測、がある。

Human Genome Project (HGP) の主たる利点の一つは、病理遺伝子およびその他の染色体領域および構造のための多数の核酸フローの分離であった。このことは、展開し得るテストの数およびインプットがこれらフローに依存しているため、DNA診断における興味を呼び起こした。近年においては、Fluorescent in situ hybridization (FISH) において特に関心をもたれており、この (FISH) とは、試験した染色体領域を備う特定の核酸フローに共役な蛍光部分でプローブを行うプロセスであり、これに続いて蛍光顕微鏡検査により蛍光部分が可視化される。

基本的な実験室内において伝統的にFISHが用いられてきているが、これと並行して、臨床分野においてもFISH技術が用いられるようになってきている。FISHは細胞遺伝学への最も進んだフローであると考えられており、FISHから得られる染色体に関する情報量は、DNAマイクロチップ法によって標準的な型から得られる情報よりずっと多い。さらに、サブゾノル (中期) 細胞遺伝学に比べて、休止期の細胞遺伝学のような技術を用いれば、診断情報をずっと速く得ることができ。

本説明によればFISH関連法は多岐にわたる。これによれば、顕微鏡の視野内の全ドメインから蛍光サブゾルを同時に得ることができ、一回の実験で多くのフローの位置を検出することができる。染色体の特定フローを用いることができることも新穎なサブゾノル法を用いることに伴う。この方法は、検査染色体を異なる色 (すなわち、人間の染色体型の4の異なる色) に着色することによりFISH検査を作り出すことができる。これにより非常に高いサブゾノルマップが生成でき、本質的にフローの数に制限されない解析が可能となる。

本説明の別の目的は、生体コンパートメントから白色光、紫外光もしくはレーザー励起光サブゾルの量的な分布マップを得ること (例えば、網膜血管における酸化および脂質蓄へキロペンチンおよび/もしくは脂質) におけるメラニン色素蓄へキロペンチン) や、健康なもしくは他の

病気の組織もしくは細胞からガン部を区別することである。このような面を顕微鏡光学によって得られる信号は、組織を異なるコンポーネントに分類するために用いることができる。この方法によればさらに、蛋白質、炭水化合物、NADおよびNADH、コラーゲン、エラスチンおよびフィブリン、および細胞および/または組織内の種々の核酸形成物を識別したり、これらの空間的な配置マップを作成可能である。所定の波長の光を用いることにより、組織（もしくは細胞）のアルカリ度もしくは酸度、組織内における腫瘍の存在のみならず出血を検知したり、その分布マップを得たり、特性付けを行ったりすることができ、検出感度は、種々の蛍光タグを用いて高めることができる。これらのタグは、細胞および/もしくは組織レベルにおいて悪性度を判定するために用いることができ、このため、この方法はガン診断および腫瘍治療の分野でも急速に展開している。生体サンプルからの蛍光光を得出すための実験室的なシステムは世界中で様々なものが知られている。今日、医学分野でのキーとなるものは、これら膨大なシステムから得られる信号および画像をどのように解析するかということであり、本発明はこの点に關するものである。

このように医療診断および治療用並びに上述のような種類の分光画像法を得ることができ、この方法を以下において分光生物学的研究用の分光生物学画像法が広く採用されておき、このような方法を有することは非常に利点が多く、この方法によれば、組織の空間構成を抽出したり、細胞および組織構成や治療プロトコルおよび薬物の定量化および有意義な表示を行ったりすること、光透過、反射、散乱および蛍光画像法を用いることができる。

#### 発明の概要

本発明によれば、生物学的な研究、医学診断および治療用の分光画像法を得ることができ、この方法を以下において分光生物学的研究用の分光生物学画像法が広く採用されておき、この方法によれば、組織の空間構成を抽出したり、細胞および組織構成や治療プロトコルおよび薬物の定量化および有意義な表示を行ったりすること、光透過、反射、散乱および蛍光画像法を用いることができる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、分光生物学画像法は、(a) 分光画像法をサンプリングを生成する工程、(b) そのサンプリングを光学装置を通して観察する工程、この光学装置は観察分光計に光学結合されており、光学装置および観察分光計は、(1) コリメータ光学要素を用いてサンプルの全ビクセルから入射光を同時に収集し、(ii) コリメータされた入射光を多数の要素を有する干渉計系に通し、まず、光が干渉計内部で異なる方向に進行する2つのコヒーレント光線に分割され、次いで2つのコヒーレント光線が

再結合されて互いに干渉して出射光線が形成されるようにし、(iii) 出射光線を、検出器要素の2次元アレイを有する検出器上に検出光線を収束させる収束光学系に通し、各時点で検出器要素の各々がサンプルの1つの全測定期間を通じて常に同一のビクセルであり、サンプルの画像は検出器アレイ面上で固定され、測定中のあらゆる時点で検出器要素が可変可能であり、各検出器要素は、異なる波長でビクセルから発生される光の強度の特定の一次結合である信号を生成するようにし、この一次結合は検出器要素の関数とし、(iv) 干渉計系の少なくとも1つの要素を回転し、干渉計系によって生成された2つのコヒーレント光線の間の光路差がサンプルの全ビクセルについて同時に走査されるようにし、(v) 記録装置を用いて各検出器要素の信号を時間の関数として記録し、データの第1のキエーラ（立方体）を形成することによってサンプルの各ビクセルのスペクトルを得るためのものである、および(c) 数値アルゴリズムを用いて第1のキエーラを解析する工程を有し、

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、この方法はさらに(d) 解析されたデータのキエーラをマッピングする工程を含んでもよい、

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光学装置は、顕微鏡、カメラレンズ、内視鏡、眼底カメラおよび顕微鏡からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記顕微鏡は、反射顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、直立（縦型）顕微鏡、倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、コンフォーカル顕微鏡、定焦型コンフォーカル顕微鏡および反射コントラスト顕微鏡からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記平行光は、サンプルからの透過光、サンプルからの反射光、サンプルからの散乱光およびサンプルからの発光光からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、サンプルからの前記検出光は、投与プロトコル光、投与プロトコル励起光および自己蛍光のグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、光源から生成される前記光は、レーザー、白色光、フイルム光透過光、紫外光および短波長レシジの光のグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光は複数の光源から生成され、これら光源は同時にもしくは順次動作される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記二次元アレイは、ビデオレートCCD、増感高ダイナミックレンジCCD、増感CCDもしくは時間ゲート増感CCDのようなCCDからなる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、サンプルは細胞、組織および微生物からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞および組織は人体から採取される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞は、例えば、染色により検出された細胞、血液細胞、胎児細胞、悪性腫瘍の疑いのある細胞、分裂・止血期の細胞、有糸分裂中細胞および還元分裂中細胞である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記組織は、臓器、神経血管、腫瘍、皮膚、角膜、髪、筋、胃、腸、膀胱、結腸、前立腺、頸部、動脈、静脈および心臓からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルが組織であり、前記方法が、神経血管における酸化および脱酸化ヘモグロビンの検出および/もしくは組織のメラニン色素比サンプルの検出である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルが細胞、組織の一部および微生物からなるグループから選択され、前記光がフローにより照射され、このフローは特定の細胞成分に結合され、前記方法は細胞成分の存在もしくはそのレベルの検出である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記フローは共役蛍光部分を含み、前記励起が蛍光部分の蛍光である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記フローがさらに核酸分子を含み、前記方法が、この核酸分子と交配する細胞核酸（デオキシリボ核酸および/もしくはリボ核酸）の存在もしくはそのレベルの検出である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記フローが抗体を含み、前記方法が、この抗体により認識される細胞蛋白質の存在もしくはそのレベルの検出である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記蛍光部分の例えは、Spectromanager、SpectruImage、Aqua、Texas-Road、FITC、ローダミン、フルオレスセイン、カスカードブルーおよびこれらの組み合わせである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数値的アルゴリズムが、サンプルの各ビクセルのスペクトルのポイントオペレーション解析である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記ポイントオペレーション解析が、サンプルにおける各ビクセルのスペクトルを変形関数に基づいてスカラーマッピングすることを含む。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によ

れば、前記ポイントオペレーション解析が、サンプルにおける各ビクセルのスペクトルを変形関数に基づいて別のスペクトルにマッピングすることを含む。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数値的アルゴリズムが形変換解析であり、この形変換解析が類似マッピングのようなスペクトル解析に類似して行われる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数値的アルゴリズムが類似マッピング解析であり、これによりサンプルの各ビクセルにおける参照スペクトルからのスペクトル差を計算する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが小さなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが大きなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは類似カラースケールマッピングを作り出し、ここでは明るいビクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いビクセルが小さなスペクトル差に対応する。

し出すようになっている。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、二つのスベクトルキエー

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析が、前記第1のスベクトルキエー

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、バックグラウンドの除去に用

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術階数によって各ピクセル

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプル内の葉緑素、ポルフィリンお

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、生物学研究、薬品開発産業、病理学に

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞質成分はNAD<sup>+</sup>、NADH、フラビンおよびチ

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプルにおける少なくとも二つの蛍

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルが細胞、組織および微生物からなる

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルはRomanovsky-Giemsa着色法、Haem

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞レベル以下の詳細の細胞およびサブピン

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞レベル以下の詳細の細胞およびサブピン

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞レベル以下の詳細の細胞およびサブピン

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は蛍光交配法であり、この方法は、(a)

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は蛍光交配法であり、この方法は、(a)

サンプルの細胞組織とを交配させるステップと、(b) 前

サンプルを観測するステップ、この蛍光顕微鏡は画像分

サンプルの全ピクセルからの射出光を同時に集光する

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する干渉計システムを通過させるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な

サンプルを有する射出器に含ませるステップと、な



なわち、サグナツク (Sagmac) 干渉計を示す。

図4は、選択スベクトルレンジを抽出するための疑似RGB (赤、緑および青) 色の定義を示す。各疑似色の強度は、曲線の一つを掛けた後、曲線の下面の面積を積分して計算される。

図5 (a) は、オリンパス顕微鏡 (IMT2) に添付のSpectraCube-5の分光生物撮像システムを用いて得られた、プロピディウム (propidium) ヨウ素で着色した細胞の蛍光スベクトルイメージを示し、図5 (b) は、本発明に方法を用いて図5 (a) に示す画像の三つの独立ピクセルからの蛍光スベクトルのプロットである。

図6 (a) は、有糸分裂中の細胞の細胞膜染色イメージを示し、分裂細胞はアクリジノレンジで着色されている。図6 (b) は、細胞のスベクトルイメージを逐く逐くするために測定された二つのスベクトルのプロットであり、細胞質領域からの第1のスベクトル (M1) はアクリジノレンジの単一形状に特徴があり、核領域からの第2のスベクトル (D1) はアクリジノレンジの二成分形状に特徴がある。図6 (c) は、参照スベクトルとしてアクリジノレンジの二成分形状のスベクトルを用いて同様なワッペンジ解析を行った結果を示す。図6 (d) は、参照スベクトルとしてアクリジノレンジの単一形状のスベクトルを用いて同様なワッペンジ解析を行った結果を示す。

図7 (a) は、*Oedogonium* sp. *alcantara* のトータル蛍光光を示し、図7 (b) は、参照スベクトルとして図7 (a) のスベクトルAを用いた同様のワッペンジ解析結果であり、図7 (c) は、図7 (a) における他の薄い黄色蛍光スベクトルを用いた同様のワッペンジ解析結果であり、図7 (d) は、参照スベクトルとして図7 (a) のスベクトルBを用いて同様のワッペンジ解析結果であり、図7 (e) は図7 (a) ~ (d) に示す映像の四つの異なるピクセルからの蛍光スベクトルを示す。

図8 (a) は、血液細胞を着色するためMay-Grunwald-Giemsa法により着色された血球細胞を示し、図8 (b) は、図8 (a) の細胞の異なる細胞レベル以下の場所 (A~E) を示す。

図9 (a) は、図8 (b) の矢印で示す五つのピクセルからの透過光スベクトルを示し、図9 (b) は、図8 (a) および (b) の細胞の外側で記録された射出光に比較して計算された図9 (a) のスベクトルに対応する吸収スベクトルを示す。

図10は、図9 (a) に示すスベクトルA,B,CおよびD/Eがそれぞれ参照スベクトルとして用いられたときの定量的な疑似ワッペンジ解析を示す。

図11 (a) , 11 (b) , 11 (c) および11 (d) は、図12 (a) に示すソクリアシジの四つの異なる場所の蛍光ピクセルスベクトルを示し、生きているソクリアシジが

顕微鏡 (オリンパスIMT2 RRC) に添付のSpectraCube™システムによって解析された、ソクリアシジ細胞は緑色光 (最大545nmのバンドパス) により励起され、このシステムにより赤色蛍光が測定された。

図12は腎臓癌細胞によるソクリアシジの蛍光イメージを示し、この解析により、(a) ソクリアシジ細胞は緑色光 (最大545nmのバンドパス) により励起され、赤色フィルター (550nm) を通して観測された赤色蛍光を示し、

(b) 図11 (a) のスベクトル1に載った疑似ワッペンジ解析により、ソクリアシジの上部に自然細胞の葉緑体の含有率の高い二つの顕著な領域が見いだされ、これはおそらく細胞核膜及び口嚢を示しており、(c) 細胞核膜の膜にはほぼ1ピクセルの空点 (図11 (a) のスベクトル2を用いたワッペン) が見られ、(d) および (e) 図11 (b) , (c) のスベクトル4,5を用いたワッペンがそれぞれ、同一区画の狭い領域に細胞を描いて、細胞質の中央部に大きな空点が見られ、(f) 図11 (d) のスベクトル6を用いたワッペンにより、消化物が細胞から排出される細胞肛門領域が見られる。

図13は、図14に示す二匹の交尾するソクリアシジの空点における葉緑体蛍光の蛍光スベクトルである。交尾するソクリアシジの空点の上部 (1) および下部 (2) の個々のピクセルスベクトルであり、スベクトル (3) は図14 A~Cに示す二つの細胞の中央核膜前におけるピクセルから得られた。

図14A,B,Cは、(a) 二匹の交尾するソクリアシジの空点における葉緑体蛍光の蛍光を示し、(b) 交尾するソクリアシジにおける空点および自然細胞を有する疑似ワッペンイメージ (図13のスベクトル2を用いたワッペン) を示し、一つの細胞は大きな食物空点を示し、もう一つは小さな空点を有し、これらはそれぞれタイプIおよびタイプII細胞に対応する。(c) 図13の低密度スベクトルがワッペンジに用いられ、細胞の細胞質における反射率色光を示す。

図15は葉緑体の進化ステップを示す。

図16 (a) および (b) は、May-Grunwald-Giemsa 染色赤芽球細胞の五つの異なる細胞箇所 (すなわち、個々のピクセル) の多重透過スベクトルおよび吸収スベクトルを示す。

図17a, 17b, 17c, 17d, 17e, 17f, 17g, 17h, 17i, 17j, 17k, 17l, 17m, 17n, 17oおよび17pは、RGC (a, g, i, m) イメージと、真正染色質 (b, f, j, n) のスベクトル、異質染色質 (c, e, k, o) のスベクトルから得られた疑似ワッペンジ結果と、前芽球 (a~d) , 好塩基性の正常芽球 (e~h) , 初期芽球 (i~l) および後期芽球 (m~p) の細胞質コンパートメント (a, b, l, p) のスベクトルから得られた疑似ワッペンジ結果とを示す。

図18a, 18b, 18c, 18d, 18eおよび18fは、B-16黒色腫細胞における光散射作での包含PP散光の細胞サイズ以下の周所化を示す。細胞は5-ALAとともに20時間培養さ

れ、400nmの光で励起され、図19-a-cのスベクトルを参照スベクトルとする疑似ワッペンジ解析を用いて赤色蛍光画像を得て解析された。

図19a, 19bおよび19cは、それぞれ図18a, 18bおよび18cに示した細胞からの4,4および2の個々のスベクトル蛍光イメージを示す。

図20aおよび20bは、血管造影媒体においてPPとともに培養された黒色腫細胞における外因性PPの蛍光周所化を示し、(a) はoxo-PPとともに培養された細胞での前部、黒色腫再部位の赤色蛍光を示し、(b) は (a) と同様細胞に1分の光照射 (4J/cm<sup>2</sup>) を行った後での赤色蛍光分布を示す。

図21a, 21bおよび21cは図20a, 20bの細胞および場所での5分の培養を行った後での細胞の付加イメージの単一ピクセル蛍光スベクトルを示し、(a) は図20aに示す細胞における細胞レベル以下の場所の異なる場所 (すなわち、個々のピクセル) からの五つの単一ピクセルスベクトルを示し、(b) は光照射の後での図20bの細胞からの四つのスベクトルを示し、(c) は場所ごとに5分間の培養を行った後での細胞レベル以下の箇所からの四つのスベクトルを示す。

図22はゾキヤンソクラ蛍光ワッペンジの三つのランダムなピクセルのスベクトルグラフであり、671nmに蛍光ピークを有する。

図23A, 23B, 23C, 23D, 23Eおよび23Fにおいて、A,CおよびEは正規化前の三つのサンゴの多重ピクセル蛍光ワッペンを示し、B,DおよびFは蛍光強度に正規化して、654nmから685nmの間で、それぞれA,CおよびEの蛍光イメージに示されたトランサクトに沿って、正規化された三次元図であり、AおよびBはFavites halicoreaで、CおよびDはGoniastrea retiformisであり、EおよびFはMillepora dichotomaである。

図24a, 24bおよび24cは、共生体 (a) Favites halicorea, (b) Goniastrea retiformis, (c) Millepora dichotoma) に隣接するピクセルに対する蛍光強度の回帰曲線を示し、いくつかの放射トランスアクトに沿った同一距離に見られるピクセルから測定した平均値が示され、第1ポインタと第5ポインタとの距離が2.4mmであり、縦線が±5.Eであり、破線が回帰曲線であり、回帰結果はFavites halicorea $r^2=0.905$ であり、Goniastrea retiformis $r^2=0.066$ であり、Millepora dichotoma $r^2=0.062$ である。

図25a, 25bおよび25cは、三つのサンゴ (a) Favites halicorea, (b) Goniastrea retiformis, (c) Millepora dichotoma) のスベクトル疑似ワッペンを示し、全ピクセルが蛍光を有する場所ピクセルと比較されている。類似性がグレイスケールで示され、明るいピクセルが高い類似性を有し、暗いピクセルは低い類似性を有する。

図26a, 26bおよび26cは、Texas-Red and Rhodamineに添付の二つの異なるフローを用いて行われた休止期I

SHを示し、(a) は顕微鏡を介して観察されるオリジンイメージを示し、(b) は本発明に係る方法によって測定されて処理された後の同一サンゴイメージを示し、(c) は、Texas-Red and Rhodamine蛍光検送体による蛍光スベクトルを示す。

図27a, 27bおよび27cは、異なる蛍光検送体により区別された六つの異なるフローを用いて行われた休止期I SHを示し、(a) は顕微鏡を介して観察されるオリジンイメージで、細胞はDAPIにより着色されており、(b) は本発明に係る方法によって測定されて処理された後の同一サンゴイメージを示し、(c) は六つの蛍光検送体の蛍光スベクトルである。

図28は、Papantoniouテスト (すなわち、Pap着色) で一般的に用いられるようにHaematoxylin-Eosin染色細胞のRGCイメージを示し、A~Fが付けられた細胞がHPV (human Papilloma virus) 癌性頸部細胞であり、B~Fが付けられた細胞が正常頸部細胞であり、C,DおよびEは多形核細胞、鱗状細胞の核およびA~F細胞の細胞質を示す。

図29は、図28のEが10の異なる主要コンポーネント、すなわち、波長レンジ (1=1,...,20) の階数としてプロットされた主要コンポーネント解析を示す。図30aはピクセル強度として図29のスベクトルRGCの値を用いて得られた黒および白色強度イメージを示し、図30bおよび30cは図29のベクトルRGCおよびRGCの値を用いて得られた黒および白色強度イメージを示す。

好ましい実施例の説明

本発明は、医療診断、治療および生物学的研究に用いることのできる分光生物撮像方法に関する。特に、本発明は、光の透過、反射、散乱および蛍光光法を用い、高い空間および分光分解度で、空間的機構を抽出し、細胞および組織成分、構造および、フローや運動等、投与された成分を定量するために用いることができる。したがって、本発明は、例えば、生体細胞の解剖および生理を研究し、単一の測定で多くの遺伝子および染色体を効果的にワッペンし、切片中の癌性もしくは他の病理性細胞を顕微鏡下もしくは生体中でワッペンし、あるいはいずれかのタイプの内視鏡もしくは基底部分カメラを通して、例えば除去すべき組織の手術中に手術室をガイドする目的で射出および固定するために、結果の解析および有用な表示を主として強化された画像形状で可能にする。

図4~30に示す本発明をよりよく理解するために、また図1に示すように2次元の検出器アレイを利用した従来の (従来の技術的) スリット型撮像分光計の構造および作用を参照する。

すなわち、図1に示す従来の技術の撮像分光計は、4次元の機械的に示す付からずの入射光を蛍光し、対象4の扁平行光を、スリット6を有する第1の焦点面に収束させて



視野を形成するための2で示す集光光学系を備える。スリット6から出射する光はコリメータレンズ8でコリメートされ、分光散乱要素10(例えば回折格子)を通して、様々な波長が分離される。分光散乱要素10からの出力は収束レンズ12によって第2に焦点面内の二次元検出器アレイ14に収束される。検出器アレイ14の出力は信号処理装置16に送られる。

図1の従来技術の撮像分光計に示された2次元検出器アレイにおいては、系の運動(例えば矢印13で示すラスタ運動もしくは直線走査)が第1次元に沿った走査を行う。第2次元の走査は系の運動方向に垂直に配されたスリット6によって行われる。したがって、スリット6はアレイ14内の各検出器があらゆる時間において1つのビクセルが単一の波長に露光するように機能することを保証する。これは各ビクセルのスベクトルを分離するために必要である。

背景技術の種および上記で述べたように、図1に示す従来技術の欠点は、光学系2がすべてのビクセルから同時にエネルギーを集めるにも関わらず、1つレームのビクセルの多くは任意の時間には測定されないことである。その結果、所要フレーム時間は有意に増大し、また/もしくはSNR(感度)はこのようなスリットを必要としない系に比べて顕著に低下する。

図2は本願に充て記載されたものとして引用するカビツ等 (Gabb et al.) の1995年5月21日出願の米国特許出願08/392,019号に開示された改良型の従来技術の撮像分光系を示すブロック図である。この撮像分光計は本発明の撮像を実施するのに極めて適した構成を有する。すなわち、図2に示す従来技術の撮像分光計は、20次元キヤナ、ブロック24で示される光路差(OPD)発生器もしくは干渉計、ブロック26で示される1次元もしくは二次元検出器アレイ、およびブロック28で示される信号処理装置およびディスプレイを含む。

系20において重要な要素はOPD発生器もしくは干渉系24であり、これは分析されるべき対象の各ビクセルから出射する光の分光強度の所定の一次結合に対応する空間光を出射する。干渉計の出力は検出器アレイ上に収束される。したがって、スベクトル再生に必要なすべての情報を得るため、すべての必要な光学位相は視野のすべてのビクセルについて同時に走査される。対象中のすべてのビクセルのスベクトルはこのようにして撮像情報と同時に収集され、後の分析がリアルタイムで可能となる。

米国特許出願08/392,019号による装置は様々な構成で実施することができ、特に、使用される干渉系は米国特許出願08/392,019号の開示する図面に記載されるように他のミラーと組み合わせることができる。

すなわち、米国特許出願08/392,019号によれば、他の型の干渉計が使用可能である。これらは、上記米国特許

出願にさらに記載されるように、(1) OPDを変化させて光を変調する移動型干渉計、すなわち、走査庫を有するフアラリペー型干渉計、(2) 光学集光系からの光線を受容するビームスプリッタおよびキヤナを含む、光線を2つの経路に分岐するマイクelson型干渉計、(3) OPDが入力光線の入射角度によって変化する、他の光学手段と結合させることもできるサニヤック型干渉計、および(4) 4つのミラーとビームスプリッタを加えた干渉計を含む。

図3はOPDが入力光線の入射角度によって変化する干渉計を利用する米国特許出願08/392,019号によって構成された撮像分光計を示すものである。光線に対して小さな角度で干渉計に入射する光線はこの角度に対して直線的に変化するOPDを付与される。

図3の干渉計において、全ビクセルにおいて光源30からの光線は光学鏡系31によってコリメートされた後、機械的スキヤナ32によって走査される。次いで、光はビームスプリッタ33を通して第1の反射鏡、さらに第2の反射鏡33aに到達し、後者によって反射されてビームスプリッタ33に戻り、これを通して、収束レンズ36を通して検出器アレイ37(例えばCCD)に至る。この光線は3、第2の反射鏡36、そして最後に第1の反射鏡34によって反射された光線と干渉する。

1走査の最後で各ビクセルはすべてのOPDで測定され、したがって、対象の各ビクセルのスベクトルはフーリエ変換で再構築される。光線に平行な光線は補償され、光線に対して角度( $\theta$ )を有する光線はビームスプリッタ33の厚さ、その屈折率、および $\theta$ の関数であるOPDを付与される。小さな角度においては、OPDは $\theta$ に比例する。適当な反転および任意深い配列によって、各ビクセルのスベクトルが計算される。

図3の構成において、角度 $\beta$ (図3では $\beta=45^\circ$ )でビームスプリッタに入射する光線はOPD=0で干渉計を通過し、一般角 $\beta=\theta$ で入射する光線は式(1)で与えられるOPDを付与される。

$$OPD(\beta, \theta, n) = t(n-1) \sin^2(\beta + \theta) - (n-1) \sin^2(\beta - \theta) \quad (1)$$

ここで、 $\beta$ はビームスプリッタに対する光線の入射角、 $\theta$ は光軸からの光線の角距離もしくは中心位置に対する干渉計の回転角、 $t$ はビームスプリッタの厚さ、 $n$ はビームスプリッタの屈折率である。

式1によれば、中心角に対して正および負の角度の両方で走査を行うことにより、各ビクセルについて両面インターフェログラムを得ることができ、これによって、相関係数の解像を促進し、より正確なフーリエ変換計算が可能になる。走査距離により正確なOPDが決定されるが、これは測定した分光強度に比例する。一方、角度差デグの大きさは系が感度を有する最短波長によって決定される。実際にサンプリング理論 [Camberlain (1979), The Principles of Interferometric Spectroscopy

John Wiley and Sons, 63~65ページ参照]によれば、このOPDスレッズは系が感度を有する最短波長の半分未満でなければならない。

考慮すべきもう1つのパラメータはマトリクス中の検出器要素の微小寸法である。収束光学系を通じて、要素は干渉計中に微小なOPDを画定し、これによってインテラフエログラムを矩形関数で畳み込む効果を生ずる。この結果、短波長において系の感度が低下し、要素によって画定されたOPD以下の波長についてはゼロまで低下すること、すなわち、干渉計の検出器要素によって画定されるOPDが装置が感度を有する最短波長よりも小さいことを保証しなければならない。

したがって、米国特許出願08/392,019号に開示された発明に従って構成された撮像分光計は単に視野内の各ビクセルから入射する光の強度を測定するだけでなく、所定の波長範囲における各ビクセルのスベクトルをも測定する。また、これらは任意の時間において視野内の各ビクセルにわたって、

表 1 :

特性	性能
空間解像度	3.0 / Mμm (M=顕微鏡もしくはは全面光学要素の有効倍率)
視野	8 / Mmm
感度	2.0 ミルクス (積分時間 1.00 m.s.e. cに對するものであり、積分時間が長くなるにつれてΓTに對して直線的に増大する)
分光範囲	400.0 ~ 1000.0 nm
分光解像度	4.00 nmで4 nm (8.00 nmで1.6 nm)
取得時間	5 ~ 5.0 秒、典型的には 2.5 秒
F F T 処理時間	2.0 ~ 1.8 0 秒、典型的には 6.0 秒

クセルによって出射されたすべての光線をより良く利用し、したがって、上述のように、フレーム時間の顕著な減少および/または分光計感度の顕著な増大を可能にする。このような撮像分光計は様々な型の干渉計および光学鏡系および収束系を含むことができ、したがって、医療診断および治療および生物学的研究用途、地質学的および農業的調査のための遠隔探査等の広範な様々な用途に使用することができ、

米国特許出願08/392,019号に開示される発明による撮像分光計はイスラエル国ミグダヘルベク、インダストリアル・バーグのスペクトラル・ダイアグノスティクス(SD)社 (Spectral Diagnostics Ltd, Industrial Park Migdal Haemek, Israel) によって開発されたものである。以下、スペクトラキエー (SpectraCube<sup>TM</sup>) と称する。様々な光学器具に光学的に接続されたスペクトラキエーシステムは本発明の方法を実施するために使用された。スペクトラキエーシステムは表1に示すような特性を有する。

スペクトラキエーシステムは、例えばC-マウントもしくはF-マウントコネクタを介して容易にあるゆる顕微鏡もしくはフクロレンズに取り付けられ、測定中はあらゆる向きに配することができる。また、このシステムは他の拡大手段および様々な型の内視鏡およびカメラに接続することができ、したがって、細胞および組織

の分光像を様々な倍率および照明法で得ることができ、

45 分光像の表示および分析

a. 一般論

上述のように分光像は、分光情報と像の空間機構とを組み合わせる3次元のデータアレイ (x, y, z) である。このため、分光像はその表示性から分光キエーと称される1組のデータであり、これは他の手段では得ること

が困難で場合によっては不可能である特性の抽出および量の評価を可能にするものである。分光学およびデジタル画像分析は莫大な量の文献（例えば、Jain (1989), Fundamentals of Digital Image Processing, Prentice-Hall Internationalを参照）によって普及されているため、以下の説明は主として単一のデータセット、すなわち分光キューブに分光および画像情報を組み合わせることの利点に絞っている。

分光キューブの可能な分析型の1例は分光および空間データを別々に用いること、すなわち、分光アルゴリズムを分光データに、2次元画像処理アルゴリズムを空間データに適用するものである。

分光アルゴリズムの1例として、各ピクセルでの強度が「類似性」の程度に比例するグレー（もしくは他の色）スケールの像（類似性マップ）を形成する。参照スケールと全ピクセルのスケールとの間の類似性を演算するアルゴリズムを考える。グレースケール像はさらに、所望の特性およびパラメータを抽出するために画像処理およびコンピュータ画像法（例えば、画像強調、パターン認識等）を用いてさらに分析することができ、学習すれば、類似性マップは参照スケール（ライブラリに予め記憶されたものでも同一もしくは他の分光像のピクセルに属するものでもよい）と分光像の各ピクセルとの差の絶対値の積分を演算し、グレーレベルもしくは傾き（白黒もしくはカラー）像を表示するものであり、この像では明るいピクセルが小さな分光差、暗いピクセルが大きな分光差、あるいはその逆にそれぞれ対応する。

同様に、分類マップは類似マップについて配載されたものと同じ計算を行い、表示された像の各ピクセルを、その分類に従って、数値の参照スケールのうちの1つに最も類似した所定の異なるカラーでペイントする。

また、非分類演算に基づいた分光像アルゴリズム、すなわち、

$$\text{gray\_scale}(x, y) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} w(\lambda) \cdot I(x, y, \lambda) d\lambda \quad (2)$$

式2において、 $w(\lambda)$  は、すべて適当に重み付けされた像のいくらかの分光領域にわたる積分に各々様々なグレースケール像を算出するための一般的な重み付け応答関数である。例えば、それぞれ赤 (R)、緑 (G)、青 (B) に対する三刺激応答応答関数に対応する3つの異なる重み付け関数 ( $w_R(\lambda)$ ,  $w_G(\lambda)$ ,  $w_B(\lambda)$ ) で式 (2) を評価すると、従来のRGBカラー画像を表示することが可能である。また、意味のある新規の (偽) カラー画像を表示することもできる。図4はこの単純なアルゴリズムの「ペイント」を示す1例である。 $w_R(\lambda)$ ,  $w_G(\lambda)$ ,  $w_B(\lambda)$  を関心のあるスケールの内部に配分されたカラー関数と考えると、この場合に結果として表示される偽カラー画像は重み付け関数に対応

なわち、周所定の分光情報および隣接ピクセル間の空間的相関を含むアルゴリズム（これらのアルゴリズムの1つは後述のように主要な分析である）を適用することもできる。

50 分光キューブ（すなわち、 $I(x, y, \lambda)$ ）のようないずれかの3次元 (3D) データを取り扱う際に自然に生じる要求の1つは意味のあるようにそのデータ構造を可視化することである。新撮影ビデオデータ等、例えば共焦点顕微鏡によって得られ、各点が一般に3次元空間の異なる場所  $(x, y, z)$  における強度を示す他の型の3Dデータとは異なり、分光像は異なる波長における同一の2次元面（すなわち、ヤンソンの強度を示す像のソーケン）である。このため、データの分光キューブを観察するための2つの最も直感的な方法は像面（空間データ）もしくは1ピクセルまたは1組のピクセルを波長の関数として3次元山谷ディスプレイで観察するものである。一般に、像面はいずれかの単一の波長で測定された強度もしくは各像ピクセルにおいて所望の分光領域にわたって分光分析アルゴリズムを適用した後に得られるグレースケール像を表示するために用いることができる。分光軸は、一般に、いずれかの所望のピクセル近傍で行われるある種の空間演算（例えばスケールの平均化）の結果として得られるスケール像を表示するために使用することができ、

25 例えば、分光像を、単純な白黒カメラで得ることのできるような像に類似したグレースケール像として、あるいは1つもしくは数種類の人口色を用いて重要な特性を強調もしくはマッピングした多色像として表示することが可能である。このようなカメラはCCTVタイプの分光領域（例えば400nm〜760nm）にわたって1ピクセルを単一の積分するものであるため、「相当する」白黒CCTVカメラ像は以下のように分光軸に沿って積分することによって3D分光像データベースから算出することができる。

30 する分光領域中のデータの積分が強調され、これら3領域の分光差はより明確に映出できるようになる。  
40 b. 点演算  
点演算は単一のピクセル（一度に1つより多くのピクセルに隣接しない）演算として定義される。例えば、グレースケール像において、点演算は、所定の交換関数に従って各ピクセルの強度（強度関数）を他の強度にマッピングする演算とすることができる。この型の交換関数の例は各ピクセルの強度による演算である。  
45 点演算の概念は分光像に拡張することができ、ここで、各ピクセルはそれ自体の強度関数（スケール）を、すなわち次元ベクトル  $I(x, y, \lambda) : \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2]$  を有している。分光像に適用される点演算は各ピクセルの

スケールを以下の交換関数によってスカラー（すなわち強度値）にマッピングする演算として定義することができ、

$$v_i = g(w_i(\lambda)) : \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2] \quad (3)$$

この型の点演算の1例は式3に従ってグレースケール像を構築するものである。より一般的な場合、点演算は各ピクセルのスケール（ベクトル）を以下の交換関数に従って、他のベクトルにマッピングする。  
50  $v_i(1) = g(w_i(\lambda)) : i \in [1, N], \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2] \quad (4)$   
ただし、 $N \geq n$

$$\text{OD}(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = -\log_{10} r(\lambda) \quad (5)$$

ここで、 $\text{OD}(\lambda)$  は波長の関数としての光学密度、 $I(\lambda)$  は測定されたスケール、 $I_0(\lambda)$  は測定された参照スケール、 $r(\lambda)$  はヤンソンの分光透過率である。式5は、 $I_0(\lambda)$  を (1) ODが計算されたものと同一の分光キューブ中のピクセル、(2) 第2のキューブ中の対応するピクセル、および (3) ライブラリ由来のスケールから選ばれたものとし、各波長で各ピクセルについて計算される。

光学密度は測定した分光応答性にもCCTV出力器の不統一性にも依存しないことに注目されたい、このアルゴリズムは相対強度をマッピングするのに有用であり、ヤンソンの吸収体の吸収係数およびヤンソンの厚さが既知である場合には、これら吸収体の絶対強度をマッピングにも有用である。したがって、以下の請求項に用いられる「レベル」という語は「量」、「相対量」、「絶対強度」および「相対強度」をも意味するものである。

他の例には様々な一次結合分析、例えば、(1) 加算、減算、乗算、除算、およびそれらの組み合わせ等の算術関数によって所定のスケールをピクセル毎のスケールに適用して新たな分光キューブを得、各ピクセルの得られたスケールを第1のキューブの各スケールと選択されたスケールとの合計、差、積、商、およびそれらの組み合わせとするもの、および (2) 所定のスカラーを上述の算術関数によって分光像のピクセルの各々のスケールに適用するものが含まれる。

このような一次結合は、例えば、背景領域に位置するピクセルのスケールをピクセル毎のスケールから減算する積算ソフトウェアクションおよびソフトウェアクションを用いて分光像中のピクセルの各々のスケールを分割する校正工程に用いることができる。

他の例にはグレーレベル画像としての比画像計算および表示が含まれる。このアルゴリズムは分光像の各ピクセルについて2つの異なる波長における強度間の比を計算し、これに対応してピクセルをより明るいもしくはより暗い人口色でペイントするものである。例えば、比較高いピクセルはより明るく、比較低いピクセル

この場合、分光像は他の分光像に変換される。

ここで、点演算の定義は異なる分光像の対応するピクセル間の演算を含むように拡張することができる。この型のアルゴリズムの重要な例は光学密度分析である。光学密度は分光的に調査されている対象の領域を透過スケールよりも高いダイナミックレンジで強調し、図示するために用いられる。光学密度は対数演算によって透過に換算し、したがって、正関数である。光学密度と測定されたスケールとの間の関係はランペル-ベールの法則によって与えられる。

10 法則によって与えられる。  
15 はより暗く（あるいは逆に）ペイントし、分光強度を有する物質の分布を表示する。  
c. 空間分光組み合わせ演算  
上述の分光像分析手法のすべてにおいて、アルゴリズムは分光データに適用される。分光的に処理されたデータは画像として表示される。この重要性は、主に定性的であり、使用者に有用な画像を提供することにある。しかしながら、その用途によっては、分光像に固有の空間分光相関を利用するアルゴリズムを適用することにより、入手可能な画像データをより意味のあるように用いることも可能である。空間分光演算は分光分析の最も強力な型で代表する。1例として、以下の場合を考える。

25 ヤンソンの異なる種類の異なる分光像で染色された1種類のセル型を含有している（ここで用いられる「セル」という語は生物細胞および器具の視野内の領域）の双方を意味する。各分光像は別個の蛍光染料光スケールを有しており、k種のセル型のうちの1つのみに結合する。k種のセル型の間についてセル当たりの平均蛍光強度を知ると、以下の手順、すなわち、(1) 画像中の各ピクセルをそのスケールに従ってk+1のクラス（k種類のセル型プラス背景）に分類し、(2) 画像を様々なセル型に分割し、各型由来のセル数をカウントし、(3) 各クラスの各々の蛍光エネルギーを合計し、これに対応するクラス由来のセルの総数で除算することからなる手順を用いることができる。  
30 この手順は分光および空間データの双方を使用する。関連する分光データは特徴的なスケールベクトルの形状（すなわち分光「シグネチャ」）を有し、空間データはその多くが目には類似して見える様々な型のセル（すなわち、セルプロファイル）からなる。この型の場合に対して理想的な型の測定は分光像である。上記の場合、セルはそれらの特徴的なシグネチャによって区別することができ、よって、適当な点演算を行うことによって、各ピクセルがk+1の値の1つに割り当てられた人工画像を生成する。異なるセル型の蛍光染料スケールが、  
35 (1)  $i=1, 2, \dots, k, \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2]$  として既知であ

り、各ピクセル  $(x, y)$  で測定されたスベクトル  $(s_{ij})$  が  $s_{ij}(\lambda)$ ,  $\lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$  であるとして、以下のアルゴリズムが可能な分類法 (上記のステップ1) である。

$$s^2 = \sum_{\lambda \in R_1} (s(\lambda) - s_1(\lambda))^2 \quad (6)$$

が得られる。ここで、 $R_1$  は隣り合う分光領域である。画像の各点 [ピクセル  $(x, y)$ ] は次いで以下のアルゴリズムに従って形成された人工画像上での標準的なコ

点  $(x, y) \in \text{クラス } k+1$  if  $s^2 > \text{閾値}$  (7)  
for 全  $i \in [1, k]$   
但し、点  $(x, y) \in \text{クラス } p$  if  $s^2 > \text{閾値}$ ,  $p$  は  $\min [s^2] = s^2$ ,  
15 解となる係数ベクトル  $C = [c_1, c_2, \dots, c_k]$  を得る。

$$F = \min_{\lambda \in R_1} \sum_{i=1}^k (s(\lambda) - s_i(\lambda))^2 \quad (8)$$

$$\text{但し、} s(\lambda) = \sum_{i=1}^k c_i \cdot s_i(\lambda)$$

$dF/dc_i = 0$  を  $i=1, 2, \dots, k$  について解く (すなわち、

$$F \text{ を最小とする } c_i \text{ の値を得る) と、} \text{ベクトル形式 } C=A^{-1}B, A=\sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s_m(\lambda), B=\sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s(\lambda) \quad (10)$$

の次元  $k$  の正方行列、

$$B \text{ は、} B_m = \left[ \sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s(\lambda) \right] \quad (11)$$

として定義されるベクトル、が得られる。

算術演算を同時に2つ以上の分光キューブおよび/もしくは所定のピクセルのもしくはライブラリ由来のスベクトルに適用することができ、例えば、データの第1の分光キューブおよびデータの第2の分光キューブに属するピクセルに属する対応するピクセル間の対応する波長間で算術演算を適用し、例えば、データの2つの分光キューブの平均化、時間変化のフーリエ変換、分光標準化等の目的でデータの第3の分光キューブを得ることが考えられる。

多くの場合、分光像に存在する対象 (例えばセル) はその化学的構成要素および/もしくは構造が互いによくちがっている、其分岐もしくは相関行列を生成する

$s^2$  をセル型1に付着した蛍光体の既知のスベクトルからの測定されたスベクトルの偏差とする。この場合、最小2乗された「距離」の定義を採用すると、

$$s^2 = \sum_{\lambda \in R_1} (s(\lambda) - s_1(\lambda))^2 \quad (6)$$

ここで、上述のステップ2および3 (画像分割および平均分光強度の計算) は式6および7に記載されたアルゴリズムに従って形成された人工画像上での標準的なコ

ンピュータ画像演算を用いて直接行われる。  
他の方法は各ピクセルで測定された  $s_{ij}(\lambda)$  を  $k$  種の既知のスベクトル  $s_i(\lambda)$  ( $i=1, 2, \dots, k$ ) の一次結合としてして表現するものである。この場合、以下の

$$F = \min_{\lambda \in R_1} \sum_{i=1}^k (s(\lambda) - s_i(\lambda))^2 \quad (8)$$

$$\text{但し、} s(\lambda) = \sum_{i=1}^k c_i \cdot s_i(\lambda)$$

$dF/dc_i = 0$  を  $i=1, 2, \dots, k$  について解く (すなわち、

$$F \text{ を最小とする } c_i \text{ の値を得る) と、} \text{ベクトル形式 } C=A^{-1}B, A=\sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s_m(\lambda), B=\sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s(\lambda) \quad (10)$$

の次元  $k$  の正方行列、

$$B \text{ は、} B_m = \left[ \sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s(\lambda) \right] \quad (11)$$

として定義されるベクトル、が得られる。

算術演算を同時に2つ以上の分光キューブおよび/もしくは所定のピクセルのもしくはライブラリ由来のスベクトルに適用することができ、例えば、データの第1の分光キューブおよびデータの第2の分光キューブに属するピクセルに属する対応するピクセル間の対応する波長間で算術演算を適用し、例えば、データの2つの分光キューブの平均化、時間変化のフーリエ変換、分光標準化等の目的でデータの第3の分光キューブを得ることが考えられる。

多くの場合、分光像に存在する対象 (例えばセル) はその化学的構成要素および/もしくは構造が互いによくちがっている、其分岐もしくは相関行列を生成する

$$B' = \text{ピクセル数} \quad (12)$$

$$B' = \text{ピクセル数} \quad (12)$$

行列の列を  $\lambda$  について平均

$$M_i = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q B'_{ji} \quad i=1, \dots, N \quad (13)$$

を定義し、第2の標準化行列  $B$

波長数

$$B = \text{ピクセル数} \quad (14)$$

$$B = \text{ピクセル数} \quad (14)$$

として定義する。

成分数行列  $C$  を行列  $B$  に対して次元  $n \times n$  の  $C = B^{-1} \cdot B$  として定義する。  $C$  は対角化し、固有ベクトルおよび固有値は  $C \cdot V_i = \mu_i \cdot V_i$ 、ただし、  $V_i$  は  $N$  個の独立単位ベクトルであり、  $\mu_i$  は  $i$  番目の単位ベクトル  $V_i$  の方向における分散を示す固有値である。一般に、最小成分がピクセルの間数として最高の変動性を示す。

成分  $(i=1, \dots, N)$  は直交基底間の要素としての分光像の形態であり、黒色画像および白色画像として別々に表示することができ、これらの画像は所定の波長でフイルターされた通常の白黒画像からは明確に得られない特性を明らかにすることができ、

分光生物画像は、画像中の化学的構成要素間もしくはは組織にわたる分光差が存在するすべての用途で潜在的に有用である。測定は事実上いかなる光学系を用いても行うことができる。今日存在する撮像装置と本発明を使用することのできるこれらの用途は以下の通りである。

(1) 反折顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、垂直倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、共焦点 (正常・定在波共焦点) 顕微鏡、反折コントラス顕微鏡等を含む様々な型の顕微鏡、これらの校正は生物学的研究、薬物開発業界、

(臨床的および解剖学的) 病理学における細胞および組織分類、血液学、最近の型を抽出するための成分分析、遺伝子同定および (間接および有糸分裂の中) 染色体におけるマッピング、遺伝病診断、細胞オルガネラ解析および生理学、核内におけるクロマチン分布および癌、細胞マッピング、拡張マッピング等を使用することができる。

(2) 正常レンズ、マクロレンズ、ズーム等を含む様々な型のカメラレンズ、および皮膚、角膜、髪、および他の人体外部組織を反折、自動蛍光、もしくは反射とされたフローラ蛍光もしくはは薬物誘導蛍光によって撮像するための眼科カメラ。これらの構成の定型的な用途には

(i) 皮膚癌のマッピング、(ii) 黒色腫と母斑 (はくろ) との区別、(iii) ポートワイン様斑マッピングおよび他の皮膚色素沈着病、(iv) 処理前、中、および後に処理時間を最適化 (副作用を最小化) するために行われるフォトダイナミック療法 (PDT)、(v) 角膜病

(3) 腫瘍、可塑性もしくは剛性のフレイバ光学要素を含む細胞膜、および肺、胃、腸、膀胱、結腸、前立腺、子宮頸部、動脈、静脈、心臓等、いずれかの体内組織を、例えば、白色光の反折、自動蛍光、およびレーザー誘導蛍光等あらゆる検出モードで、通常および毎分状態の両方で、短波長および多波長型両方の型を用いて、撮像するのに関連した他の内視鏡を含む様々な型の内視鏡。これらの構成の円形または矩形の断面の細胞膜マッピングおよび病理学者および手術前、中、後の外科医のための分析器具、および手術中に病変組織の境界を正確

に可視化するためのものを含む。

- (4) 基底部または他の様々な基底組織、すなわち細胞質もしくは核の構造的状態によって引き起こされる遺伝子のようなあらゆる型の細胞疾患を、分析および初期診断器具の双方として、また組織のどの部分が冒され、病的監視および組織組織をマッピングするために現在使用されているフルオレセセンス画像撮影法の追加物もしくは置換物として、何時治療するかを決定するための治療薬として、マッピングするために用いられるもの、
- (11) 組織のレーザ治療中に眼科医が光凝固もしくは切除すべき組織の領域および/もしくは境界を示すための器具とするもの、

上述のように、透過、反射、散乱および蛍光光学における分光生物画像法は多くの実験方法および特定の用途がある。よって、全般に、光のような分析すべき放射線は広範な供給源に由来することができ、例えば、供給源は放射線を自然に放射するものであっても、もしくは他の照明方法から放射線を反射するものであってもよい、また、UVやレーザーの適当な照明と共に、また照明波長が検出放射線に到達するのを防止する適当な手段と共に、各場合に問題となる単数もしくは複数の対象に関する異なった情報を得るために、蛍光もしくはラマン分光法検定を行うことができる。

#### 蛍光顕微鏡法

##### a. 一般論

多数の染料の使用 [Jain (1989), Fundamentals of Digital Image Processing, Prentice-Hall International (参照)] は組織および細胞分析器具のうち、最も強力かつ一般的なもの一つである。したがって、蛍光顕微鏡法は光学顕微鏡に用いられる最も重要な実験方法の一つである [Lakowicz (1983), Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York, London]。蛍光プローブのバリエーションは主として特定の染料が結合する生物学的構造の多様性による [Raggenbarger (1986), Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, Taylor et al (Ed), New York: Alan R. Liss, Inc., 3~28ページ]。蛍光プローブの詳細な検討については、Mason (編) (1993) Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Techniques Series, Sattell Academic Press Limited, London, および Mason and Tanke (1987), Introduction to Fluorescence Microscopy, Oxford University Press, Royal Microscopical Society を参照されたい。

新技術、より洗練された多色蛍光染料分子の急速な開発により、これらの染料の潜在力を充分に利用すること、より進んだ蛍光検出技術への要求が形成され続けている。蛍光染料がこれまでで、今後も、現在行われている研究の過程で与えるであろう革命的な貢献についての議論に関しては、Taylor et al (199

- 2). The New Vision of Light Microscopy, American Scientist, 80巻, 322-335ページを参照されたい。

分光生物画像法は単純なフィルムに基づいた方法に対して、蛍光画像用途にいくつもの重要な利点を提供し、これらの利点は以下のものである。(1) 関心のあるサンプル中の染料分子の実際の挙動に対してより多くの定量的知見を提供する完全なスベクトルの測定、(2) 望ましくないバッキングラウンド蛍光によって起こる従来の問題の多くを解消する能力、(3) 蛍光プローブの発光スベクトルにそのミクロ環境 (例えば温度) によって生じる望ましくないあるいは予測できない分光シフトを考慮してフロー速度を決定できるが、これに対して、蛍光強度がペンドラムスを用いてのみ測定される場合、このような分光シフトは検出されず、フロー速度分析時に顕著な誤差を引き起こす。(4) 蛍光像取得の単純化、そして、以下詳細に述べられるように、適当な分光分析アルゴリズムと共に使用される場合、単一の測定で、多くの分光的に重なる蛍光染料を分離かつマッピングし、その分類アルゴリズムのような洗練されたデータ分析アルゴリズム (Marras and Nees (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain) を適用することにより、多くの分光的に関連したパラメータを同時に分析することが可能である。

25 分光生物画像法は、望ましくないバッキングラウンド蛍光に関連する問題を解消する手段を提供する。蛍光画像顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の駆動波長で励起されかつプローブの蛍光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器 (例えば、眼、カメラ等) に到達するように保証する蛍光フィルタキーンを用いて行われる (Mason (編), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Series, Sattell Academic Press Limited, London)。蛍光強度は通常、励起源よりも数オーダー低いので、このようなバックグラウンド蛍光は完全に排除できない [Benson et al (1986), Cell Biol., 100, 1309-1320ページ]。望

35 ましくないバッキングラウンド蛍光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジョロイックミラーコーティングおよび/もしくはフィルムが完全に遮断されないい面起原からの放射線、(2) サンプルおよび時には光化学薬品にも由来する自然蛍光は顕微鏡バックグラウンド蛍光に寄与する。サンプル自然蛍光の効果は通常、吸収および蛍光帯域が測定サンプルのそれらと重ならない蛍

40 光プローブを選択することによって低減することができ

45 同様に、自然蛍光を低減するように適当にコーティングされた光学要素を選択することにより、(3) 面起原の自然蛍光は最小化することができ、(3) 面起原のルタ、ジョロイックミラーおよびバリアフィルムなどの不適当な (もしくは最適でない) 組み合わせ、望

50 入手可能な最善のフィルムリソソグラフィ方法であっても、望

ましくないバッキングラウンド蛍光によって、関連する発光をそのバックグラウンド (ノイズ) から引き出すことはしばしば困難となり、時には不可能となる。一方、分光生物画像法は(1) 蛍光染料の分光形状および分光領域と(2) バッキングラウンド蛍光 (自然蛍光を含む) の分光形状および分光領域との間の分光差を用いて、望ましくないバッキングラウンド蛍光の効果を除去することができる。

したがって、適当な分光像分析方法を蛍光プローブの発光スベクトルに適用することにより、蛍光画像検定のS/N比、したがって、その精度を向上させることが可能である。結果の定量化が望まれる場合、この分光生物画像法の利点は比画像法に特に重要である。また、分光生物画像法は、フィルムをベースとした測定で最善のフィルムを選択するのに費やされる時間および労力を節約することができ、

られる利益を十分に顕微鏡するためには、多数のフローラを含むサンプルからの蛍光を測定するためにフィルムをベースとする方法を使用する場合の典型的な工程を考えると、まず、互いに充分に異なる吸収および発光スベクトルを有するフローラを選択しなければならぬ。現在、実際には、この要求により、試料中の蛍光領域の数は3ないし5に制限される。次いで、面起原を抑制するための1つと発光スベクトルを補正するための1つとからなる2つのフィルムホルンを補正することにより、あるいは、面起原を抑制するための1つのフィルムホルンを補正する一方で3重ジョロイックフィルムで発光スベクトルを補正することにより、各試料に対して1つずつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回収可能なフィルムを用いて面起および/もしくは蛍光波長を制御する方法は提案されている。近年、多分光干渉フィルムを用いて多数の蛍光体を画像することが可能になった

蛍光測定において分光画像法が、望ましくないバッキングラウンド強度をどのように除去することができ、その例を図5a~5bに示す。図5aは酸化プロピジンで染色された細胞の蛍光分光像を示す。この像はオリンバース社の倒立顕微鏡 (IM2) に取り付けられたスベクトラキーンを用いて得たものである。サンプルは水銀光線で照明し、蛍光強度はDMFフィルムキーン (DM580ジョロイックミラー、DS50面起フィルムおよびBP545バリアフィルム) を通して撮像した。図5bは3つの別個の像で示されるに由来する蛍光発光スベクトルをプロットしたものである。3つのスベクトルが各々2つのピークを示していることに着目されたい。623nmのピークは酸化プロピジンの実際の蛍光発光スベクトルによるものであり、715nmの第2ピークは面起もしくはバリアフィルムで完全に排除されなかった面起光の残りに過ぎない。この望ましくないバッキングラウンド放射線はさらに別の面起フィルム (例えばオリンバース社のPM460) もしくは適当なバリアフィルムを追加することによって除去可能である。しかしながら、同じ測定で (PM460フィルムを用いない、非分光) 撮像系で行われたとすると、各ピークで測定された強度は、715nmピークの望ましくない信号の寄与を含む図5bに示したスベクトルの部分に比例することになる。この光強度を改善するように、従来のCD像に適用することのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), Cell Biol., 100, 1309~1320ページ]。しかしながら、各ピークでの蛍光を波長の関数として測定する分光生物画像法を用いれば、容易に分析を、関心のある蛍光染料の発光に対応する波長 (例えば623nmピークの周辺) のみに限定し、その結果は図5aに示す像において行われたように、残存する信号の供給源の寄与を除去することにより、本発明の方法による分光生物画像法のバリエーションを適当な蛍光領域と組み合わせることにより、多色蛍光像の取得は大幅に単純化させることができる。分光画像法によって得

2, 502~512ページ]。 (例えばフィルムキーンを交換することによって) ジョロイックミラーを交換する手段も必要である。各波長において像の焦点を再調節することも頻りに必要となり、時には、より高いS/N比を得るために、CDカメラの露光時間さえも代えなければならぬ。この結果得られる、各々異なる蛍光染料の発光に対する白黒画像は次いで顕微鏡色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いることによって) 重ね合わせられる。こうして得られる画像は数個の蛍光画像の位置をそれぞれ異なる色で示す。ジョロイックミラーの位置のわずかな変化によってデジタル画像が逆シフトするため、多数重ジョロイックミラーの使用 [4重波長ペンドラム特性を有するジョロイックミラーの使用についてはHirakawa et al (1992), Seminars in Cell Biology, 第2巻, 163~164ページを参照されたい] または重ね合わせに先立つ画像の位置合わせが必要である。画像位置合わせ法はより一般的であるが、時間がかかり、しばしばわずかに精度な結果を生じるに過ぎない困難な問題である。これらはまた、多色蛍光像を得る際に考慮しなければならない技術的課題である [Raggenbarger et al (1989), Part B of Methods in Cell Biology, 第4巻, 17巻, 449~460ページ, Taylor et al (Ed), Academic Press社]。

40 したがって、本発明の分光生物画像方法はフィルムをベースとする方法が蛍光画像法に類似した基本的な制限の1つを克服する。(後述のテキサスインスツルツおよびローダミン蛍光体の実験例に示されるように発光スベクトルが大幅に重なり合う染料を含む) 無制限の数の蛍光染料の発光スベクトルを同時に測定可能とすることにより、分光生物画像法は多数の蛍光プローブの発光像を同時に得る必要をなくす。使用される蛍光プローブが一般的に面起源で面起可能な場合、分光生物画像法の使用による利点は最大となる。この場合、単一の分光像取得により、ほ

は細胞内の蛍光染料の蛍光を捕捉でき、(1) 置換、(3) 固定もしくは蛍光アマルタの交換、(4) 焦点および/もしくは露光時間の最適化もしくは画像の位置合わせが必要なくなる。もちろん、重点は一般的に供給源で固定できる適当な染料を選択することにある。したがって、互いに受容される蛍光エネルギーで固定される染料は、蛍光生物像系を用いる多色蛍光顕微鏡の使用は(例えば顕微鏡下における)視覚検出をより困難にする。しかしながら、この制限は本発明の分光生物像法方法を使用することによって解消される傾向にある。

#### 多色蛍光体の分光固定

本発明による分光生物像法の使用により、数多くの染料(すなわち、蛍光体、蛍光部分)を1回の固定で同時に測定することが可能になる。染料の型にはならぬ制限がなく、分光的に重なり合う染料(例えばローダミンとテラサスレッド)も後述(実施例6参照)のように適当なアマルタを適用することによって固定し、それら出現を画像中にマッピングすることができ、多くの染料を同時に使用する場合、それらの励起波長、蛍光強度および蛍光スベクトルを注意深く考慮するべきである。これでき適切に行われた場合、結果は定量的に分析することもできる。例えば、数種のタンパク質を、これらに特異的に結合する蛍光標識された適当な抗体を用いた単一の測定においてマッピングすることが可能である。構造的な校正された染料を用いて絶対強度を測定することも可能である。多数蛍光フローの検出が顕著な利点となり得る重要な1例はFISH(蛍光インジケーションマイクロアッセイ) [Emanuel (1993), 'Genetic Genetics and Hormones' 9, 6-12ページ] であり、これは染色体レベルで遺伝子欠陥の可能性を現見するために用いられる。

多くの癌および出展欠陥を含む多くの癌の癌および癌者は1つ以上の遺伝子欠陥によって引き起こされ、他の多くの癌の癌は遺伝子成分を有すること、すなわち、単独では癌を引き起こさないが、それに寄与し、あるいは生命の後期において癌を進展させる遺伝子欠陥が存在することを知り、あるいは推測されておき、当分野においては、多因病および遺伝子欠陥と呼ばれる現象である。既知の癌と可視遺伝子欠陥との相関によって、医師は明確な診断をし、多くの癌の早期診断および治療を可能にする。遺伝子カウンセリングは予知される癌や危険性のある個人に将来の潜在的な深刻な問題を警告することができ、適当な介入を可能にするものである。

これまでに5000を超える遺伝子的障害が固定され、それらの多くは多遺伝子欠陥と関連づけられている。染色体が遺伝情報の中核であることが発見された後、科学

者は特定の障害の原因となる染色体内の可視欠陥を裏付けることが可能であると推測した。1960年代にライブラリに展開された有糸分裂染色体の顕微鏡ベースの分離のために染色技術が開発された。数10年におわり、染色体バンド化パターンはヒト遺伝子地図と有糸分裂染色体の観察される構造的異常とを相関させるために使用された。染色体は典型的にはギーザ染色(G-バンド化)の後に明視野顕微鏡法で観察されるか、あるいは、蛍光染色後に蛍光顕微鏡法で観察され、長方向に沿った特徴的な明帯パターンが明らかにされる。患者のバンド化パターンを正常な染色体のものとは注意深く比較することにより、異常な遺伝子病を引き起こす転移(染色体間もしくは染色体内の遺伝子物質の交換)、欠損(染色体もしくは染色体片の損失)、追加、反転および他の欠陥のよう

な異常が明らかにされる。

しかしながら、例えば、慢性緑内障(CP)や他の多くのもののような多くの深刻な遺伝子病は1つもしくは数個のヌクレオチドのみの追加、欠損もしくは置換を伴う突然変異によって引き起こされる。このような小さな欠陥は上述の染色バンド化技術では検出不能であり、多年におわり、細胞遺伝学者は数か所な欠陥を見いだすつ定量化するための技術を開発しようとしてきた。

蛍光インジケーションマイクロアッセイ(FISH)は通常25年間に多くの補完的技術の改良によって発展した。その出現は、染色体上の遺伝子位置をマッピングするためのより良い器具を開発し、染色体の総長をマッピングできない小さな遺伝子欠陥を検出しようとする細胞遺伝学者の要求によって促されたものである。ヒトの全遺伝子を固定かつマッピングしようとする大胆な計画であるヒトゲノムプロジェクト(HGP)はFISHに頼る現存、必要の多いDNAフローの開発を促進し、また、現在のFISH技術は同時に強力な免疫学的フローの開発、顕微鏡法および分光法用の優れた蛍光染料の種類を増大、および蛍光顕微鏡法に用いられる対物レンズ、照明器およびFISHの創的な改良によって可能となった。

FISHのパワーおよび有用性は多くの要因による。(1) FISHは分離された染色体および核のみならず、固定されたパラフィン埋め込み組織切片内の全細胞に対して使用できる。(2) これは比較的小さな欠陥を検出できる(より小さな欠陥を検出する能力は一定して増加している)。(3) これは結果を比較的迅速に提供することができる。(4) その適度な費用により、多くの診断および研究所での使用が可能である。(5) 様々なフローおよび顕微鏡法に対する応用範囲が広い。(6) 高い特異性および感度。(7) 典型的には2時間である短い処理時間で得ることができる。

FISHの多くの用途においては、細胞遺伝学者は顕微鏡の接眼レンズもしくはモニタ上の像を観察するだけで、蛍光標識が存在するかどうかを決定することができ、いくつかより複雑な標本においては、1つもしくは

2つの着色された標識を単純計数することができ、しかしながら、デジタル画像を処理し、かつそれらから数量データを抽出することができるといえる能力により、FISH技術には所定可能な可能性が追加される。本発明のこのような適当な画像法は、標識された染色体および遺伝子座を明確に固定できるように微細なFISH画像を強化することができ、容易に達成可能な実験条件下で、標識された部位を自動的に測定することが可能である。また、各標識された部位を測定し、DNA量を計算して、例えば、特定の遺伝子の、存在する複製数を明らかにすることもできる。多色FISHのような新規技術はカラー画像分析を用いて多数(3, 4, 5およびそれ以上)の蛍光フローを検出し、定量化する。

上述のように、FISHは標識されたフローの位置、各染色体上の標識された部位の数、および各部位における標識の強度(遺伝子物質の量)に関する情報を提供することができる。動原体(反復DNA)フローは各標識染色体に存在する複製を標識し計数するために用いられ、遺伝子座間に特異的なフローは遺伝子物質の領域の位置をマッピングするために使用される。これらの型のフローの両方は既述のタイプの相関後および有糸分裂染色体スプレッドに用いることができ、視覚的に計数可能である。これらは、特定の染色体、染色体断片、もしくは遺伝子の複製を過多もしくは過小に有することによって特徴づけられる遺伝子を固定するために慣習的に使用される。ある種の癌のごく初期段階においては、細胞が異常と認識される前に、特定の遺伝子の数が増大する、当分野において、遺伝子増殖と呼ばれる現象が起ることがあるが、これは遺伝子型特異性フローの使用によって検出可能である。FISHを用いて癌性細胞中の染色体異常を検出すると、病気が到達した発達段階を指摘し、したがって、その多くの効果段階に対して特異的な、最適な治療を選択することができ、したがって、貴重な時間を節約し、患者の苦痛を最小化し、最も効果的な段階に特異的な治療を選択される。

1つの特定の染色体を(例えばフロー血球計算により)分離することによってその染色体の全表面を均一に標識し、これを(例えば音波処理によって)物理的にもしくは(例えばエンブラスクレーパーによって)酵素的に切断し、全片に対して1組のフローを発生させることが可能である。全染色体フローは染色体バンドとしても知られており、標識染色体のすべての複製が蛍光標識するものである。染色体ベントインの重要な用途の1つはあらゆる種の癌で特徴的に起こるような2つの染色体間の欠陥および転移の検出にある。

例えば、染色体Aが特異的に緑のベントで標識され、染色体Bが特異的に赤のベントで標識される場合、AからBへの物質のあらゆる転移は赤い染色体上の緑色領域(あるいは反対)として認められる。典型的には、正常な染色体から発生した染色体ベントを用いて

異常な(患者の)染色体の欠陥もしくは転移を検出する。逆染色体ベントインは異常な染色体から発生したフローを用いて、異常な染色体に物質を寄与した様々な正常な染色体に由来するDNAを固定する。

比較アマルタマイクロアッセイ(CGH)は逆染色体ベントインフローの交換であり、染色体の完全な組から2つのフローの交換であり、染色体の完全な組から1つのカクテルは正常な1組の染色体から発生し、他は1組の異常な(例えば腫瘍)染色体から発生する。2つの組のフローは異なるレポーター分子を用い、例えば、正常なDNAが赤い蛍光を示し、異常なDNAが緑の蛍光を示すようにする。正常な分裂中期のスプレッドは両カクテルで同時にハイブリット化され、カラー画像分析を用いて評価される。赤よりも緑の蛍光が強い正常な染色体領域は、患者の異常な細胞中のその遺伝子でDNA増殖(多数の遺伝子複製)が起きたことを示す。緑よりも赤の蛍光が強い(緑/赤比の低下した)領域は、患者の染色体中の遺伝子欠陥部位を示し、赤と緑の蛍光が同等である領域はその部位でDNAの変化が起こらなかったことを示す。CGHおよび関連する技術は従来の標識よりも複雑であるが、従来可能であったよりも、より微細かつ広範囲な遺伝子変化を検出かつ定量化することを可能にするものである。

上記の説明から、後記判定、転移/再配置検出、染色体欠陥/増殖、および遺伝子マッピングが、単純なカラー一色画像の代わりに、比較的高分光強度で全分光像を構築する本発明の感度の高い定量的な分光像法によって、大いに利益を得ることがわかる。その理由は、このような方法がサンプリング時間を短縮し、ハイブリット化された蛍光フローをバッキングアップに依存するものから、小さな分光シフトによって区別することとを可能にし、極めて多数のフローを同時に測定することとを可能にするからである。

したがって、本発明の目的の1つは、フロー技術における利点を活用するFISH像法を提供することにある。本発明によれば、任意の染色体成分において分析可能なフロー像を大幅に増加させ、かつ従来技術の方法に比べて自動化の速度および程度を劇的に向上する。

本発明のFISH像法はスベクトラキエンス系を利用するものである。単一の実験で顕微鏡視野内の全ピクセルからの蛍光スベクトルを同時に得、数多くのフローの位置を検出できるものである。染色体特異性フローおよび新規の標識法が入手することに適応して、これらの方法は異なった色(すなわち、ヒト型型については2色の異なる色)でベントされた各染色体を有するFISH像法が形成可能である。これらの方法により、極めて高いサンプリング処理能力が得られ、実質的に無制限の数のフローについて分析が可能になる。

上述のように、本発明の主要な概念の1つはFISH分析に多くの蛍光フローを使用することにある。FISHに用





れが蛍光を発するか、その吸収したエネルギーを第2の蛍光体(フセセタ)に転送して後者を蛍光発光させることができるように、注意深く選択される。したがって、蛍光スベクトルの違いからドナーとフセセタとを識別することが可能である。

ドナーとフセセタとの物理的分離は、エネルギー転送効率には2つの蛍光体間の距離に強く依存する(典型的には効率は分層距離の6乗の逆数に比例する)。これらの2つの蛍光体を2つの異なる型の分子もしくは2つの異なる状態にある同一の分子に付着させ、(距離的に取り付けられた)分光生物顕微鏡を用いてFRETを測定すると、異なる分子(もしくは分子状態)を、それらの空間的分布を同時に測定しながら、識別する能力が容易なものとなる。エネルギー転送現象に関する詳細な情報は当分野の文献に見出すことができる [Herman (1989), Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, パートB, 第8章, 219~243ページ, Taylor and Francis, Academic Press社; およびJovin and Arndt-Jovin (1989), Cell Structure and Function by Microspectrofluorimetry, 第5章, Academic Press社参照]。FRETは3つのパラメータを測定することによって行われる。これらは (i) ドナー吸収ピークで励起された時のドナー蛍光ピーク強度、(ii) ドナー吸収ピークで励起された時のフセセタ蛍光ピーク強度、および (i) フセセタ吸収ピークで励起された時のフセセタ蛍光ピーク強度である。次いで、これらの3つのパラメータを校正および分析して、検査中の2つの蛍光体の分離距離および位置を得る。

分光生物顕微鏡系、特にスベクトラキエーテスを用いることにより、測定結果が向上するのみならず、測定が容易になる。実際、分光生物顕微鏡を用いることにより、面々がドナー吸収系にある場合にはドナーおよびフセセタ吸収系の双方が同時に測定可能であるため、2回の測定しか必要とされない。

分光生物顕微鏡法を用いることにより、FRET法をさらに発展させることができる。例えば、FRET用に、環境変化に感受性を有するフセセタを選択し、分子距離測定と同時に、比濁法を用いてミクロ環境変化をモニタリングすることができる。さらに別の例としては、FRETを2つの異なるフセセタと共に用い、(異なる蛍光スベクトルを2つの分離距離および蛍光体位置に関する情報を同時に供給することができ、二重フセセタ系顕微鏡を従来の方法で行うのは極めて困難である。分光生物顕微鏡の使用はFRET結果の精度を高め、実験手順を簡略化し、より強力な分析法を可能にすることができる。

**透過顕微鏡法** 光学顕微鏡法は生物学および物理学において細胞および組織を可視化するための最も基本的な技術である。透過顕微鏡法は細胞小器官および構造の細胞本質的に低いコントラストの影響を大きく受ける。このコントラ

ストを改善するために数多くの方法が開発されており、それらには染色および空間フイルタリングが含まれる。本発明の分光生物顕微鏡法の使用は、透過顕微鏡法で検査される細胞および組織の見掛け上のコントラストを増大させるための最も直接的な方法の1つであり、これによって、この一般的な顕微鏡的方法に固定および識別能力は劇的に改善される。ここで提供される基本的な手法は、分光像を測定し、次いで、この大量の情報を分光的および形態学的分析法およびアルゴリズムと共に使用し、細胞および細胞下の細胞を同定かつマッピングしようとするものである。

生物学試料の組織学的検査を促進するために、前世紀中に、細胞中の異なる巨大分子に特異的に結合する有機染色を用いる様々な染色技術が開発されたが、分子ベースの染色技術は今日まで経路の最も基本的な手法である。他の画像コントラスト強化法には特異的および偏光法のような空間フイルタリング技術の使用が含まれる [Kim (1987), Quarterly Reviews of Biophysics, 20, 201~259ページ参照]。最も一般的な染色技術はローナウスキー-エーザ染色およびヘンリー-キーン-エーザンである。ローナウスキー-エーザ染色法は2つの染料を用いるもので、その1つはアズールB (リメチルメチオニン)、すなわちチアジン染料であり、2つ目はエオジンY (ヒドロキシキサンテンプロロイド) である。チアジンはカチオン性染料であり、したがって陰性細胞成分に結合する傾向にあり、エオジンはアニオン性染料であり、塩基性細胞成分に結合する傾向にある。これらの2つの要素はいわゆるローナウスキー-エーザ効果を形成すると広く認められており、この効果は、いくつかの染色部位で特定の染色の新しい染料複合体の形成として現れる。アズールB-エオジン複合体の分子ベースは不明である。ある著者はアズールBがDNAの糖鎖基のようなアニオン性構造に結合し、エオジンは同時にDNAの糖鎖基のカチオン性部位およびアズールBの双方に結合すると考えている。より最近に提案されたアズールB-エオジン複合体のモデルでは、フリロドットおよび同僚 [Friedrich et al (1990), Histochemistry, 93, 247~256ページ] はアズールBが最初にDNA分子の糖鎖ジエチル残基に結合すると示唆した。著者はエオジン分子のフェニル基が(単一に存在する)アズールB分子に結合する部分であると仮定し、紫色はエオジン吸収ピークの赤色シフトの結果であり、これは結合したエオジンの誘電率によって引き起こされる。このようなアズールB-エオジン複合体の存在そのものは他者によって依然として疑問視されている [Friedrich et al (1990), Histochemistry, 93, 247~256ページ; Bittrici et al (1993), Lasers in Surgery and Medicine, Profile (1994), IEEE Journal of Quantum Electronics, Qe-20, 1502~1506ページ; Herman (1989), Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, パートB, 第8章, 219~243

ページ, Taylor and Francis, Academic Press社; およびJovin and Arndt-Jovin (1989), Cell Structure and Function by Microspectrofluorimetry, 第5章, Academic Press社参照]。

どの技術でも、染色によって、細胞の細胞下区画を識別し、特に狭いクロマチン機構を識別することが可能である。ダーナウラに染色されたヘテロクロマチンとベンジに染色された真正クロマチンの間の比は細胞切片中の細胞を評価する際の主要な決定因子の1つであることが確立されている。しかしながら、染色された材料から得られた結果は依然として、ある程度は、経験、技術、および主観的解釈の問題である。科学者の経験による効果を低減するため、有機染色と巨大分子との間の相互作用の分光特性を研究し、したがって、DNA染色のいわゆるローナウスキー-エーザ効果を評価しようとする試みが行われた。

透過光学顕微鏡法に適用された分光像は細胞および組織の寸法、形状およびチン特性の定量的測定を大幅に向上させることができる。この技術は形態計測と呼ばれ、生物学および物理学において急成長している分野である [Ehrer et al (1993), Modern Pathology, 6, 612~618ページ]。形態計測分光像分析は微細な細胞学的および臨床的性質を評価し、診断的および予知的評価のための有用な超構造および医学的情報を得ることを可能にする [Hyattine et al (1992), Cancer, 69, 88~212ページ]。本発明の方法による分光生物顕微鏡を用い、染色された組織における真正クロマチンに対するヘテロクロマチンの出を定量的に測定し、かつ異なる細胞小器官を同定する能力は下記および実施例2で示される。

細胞生物学における分光生物顕微鏡の利点は、この技術が特定の染色された細胞の分光的特徴を点ごとに測定できることにある。細胞画像の各ピクセルは特定の点における透過光に動する正確な情報を提供し、これは直ちに吸収スベクトルに変換される。図8aは血漿用のメダグレンソルボーキエーザ法によって染色された血漿血管を示すものである。図8aは細胞の様々な細胞下部位、および矢印で示された4つのスベクトルが収集されたピクセルを示す。ピクセルAはヘテロクロマチン、ピクセルBは青色染色された細胞質溶質領域、ピクセルCは細胞質小胞、ピクセルDは細胞質溶質中の点を示す。これらのうちの5つに過ぎない。図9aは細胞画像のこれらの5つのピクセル由来の透過光スベクトルを示す。これらのスベクトルは、外部照明光源について校正されていない。真正クロマチンおよびヘテロクロマチンからの透過光は強度が低く、いくつかの分光差を示す (図9aにおけるスベクトルAおよびCを比較されたい) ことが認められる。一方、細胞質溶質から得た点のスベクトル(B)は特異的な変化、特に光強度差を示す。図9bは細胞外に配置された入射光に相対的に計算された対応スベクトルの

吸収を示す。染色された細胞中の細胞下区画 (A~E) は画像中に内蔵で認められる色範囲の原因となる分光特性を有することが認められる。しかしながら、内蔵は異なる青色巨大分子複合体をそれらの色に基づいて識別かつ分離するには能力が限られている。スベクトラキエーテスベースとするシステムを本発明と組み合わせると、画像から選択されたスベクトルを、全画像を構成する他の1万個の異なるスベクトルと比較すること可能になる。したがって、画像の各点は選択された(すなわち参照)スベクトルに対する、あるレベルの類似性によって特徴づけられる。上述の類似性マッピングと呼ばれる数理アルゴリズムは元の分光像からグレーレベル画像を形成する。原則として、このアルゴリズム (および他の多くの類似したアルゴリズムが試験可能である) を用いることにより、選択された参照ピクセルと類似した特性を有する画像中のすべてのピクセルを見出すことができる。この技術は染色された細胞中の微細部を識別する内蔵の能力を高める。このような画像は特定の画像に動する定量的な結果として定義することができる。

図10a~dは図9aのスベクトルを用いて再構成した4つの定量的類似性マッピング画像を示すものである。図10aは図9aのスベクトルを参照スベクトルとするマッピングで再構成された類似性マッピングである。核内の真正クロマチン領域の微細構造が顕著に強調されている。真真正クロマチンネットワークのその後全部にわたって密に結合し、核膜の上部にまで及んでいることが検出できる。核の中心には特に明るい部位があり、核小体を示すものと思われるが、この推測は図10aに示す類似性マッピングによって支持される。図10bは図9aの参照スベクトルBを用いて構成された類似性マッピングを示すものである。この図では2つの主要な特性が認められ、これらは双方とも境界に関連する。その1つは細胞の中心にあり、他方は細胞外膜を画定するものである。新規に形成された画像は、細胞質溶質の中心の明るいアローは大きなミトコンドリア複合体であるという考えを支持することができる。この解釈は、ミトコンドリアを取り巻く周囲の液胞を示す図10dの類似性マッピングによって支持される。図9aの参照スベクトルCを用いたマッピング後の数値マッピングを図10cに示す。この画像は図10aに示したものと補完的であるが、他方、核ヘテロクロマチンの様々な複合体間におけるいくつかの予期できない結合を示している。最後に、図10dは、図9aのスベクトルDおよびEを組み合わせたマッピングによって得られたものであり、細胞質溶質中の液胞構造、主として細胞質液胞を明らかにしている。驚くべきことに、この類似性マッピングは、細胞下区画を取り巻く別の膜である核膜を識別する。

これらのメダグレンソルボーキエーザ染色された細胞の分光像結果に基づけば、各点 (もしくはピクセルとして定義されるもの) は、数値のカテゴリに分類できる



その特異的な吸収および透過スペクトルを有している。

研究の現時点では、紫色ロマンキーギー中核合体、特に示されるものと高い相関を有することの分光成分を示すいくつかの光線が存在する。ヘテロクロマシンの吸収スペクトル (図10c) は明らかに640nmにおいて顕著なピークを示しており、これは「紫色ロマンキーギー中核合体」と記載されたものと良好に対応する [Friedrich et al (1990), *Histochemistry* 93: 247 ~256; ページ: Bittitelli et al (1990), *Lasers in Surgery and Medicine: Profile* (1984), *IEEE Journal of Quantum Electronics* QE-20, 1502~1506; ページ: Herman (1989), *Fluorescence Microscopy of Living Cells in a Culture*, パートB, 第8章, 219~243; ページ: Taylor and Wang編集, Academic Press社, およびJovian and Arndt-Jovin (1989), *Cell Structure and Function by Microspectrofluorimetry*, 第5章, Academic Press社参照。分光的な細胞質特性 (図9aのスペクトルB) は類似性ワビングに用いられると、拡張、シフト、細胞質拡張、および細胞膜を示すと考えられる成分を明確に識別することを可能にする。しかしながら、染色された細胞は、空気中で乾燥されると、細胞質の重なりを招き、これによって見掛け上の解像度が低下することがある。細胞の特定の深さに集中し、したがって、この技術の可能性を顕著に向上することの可能なアルミと平面定細胞の使用が、分光画像をさらに発展させるために示唆される。

ある場合には、透過および染色細胞を用いて得た分光像が、蛍光顕微鏡技術によって見出されるものと類似した情報を提供することができる。分光蛍光生物画像と逆走査顕微鏡法とを組み合わせることの利点の1つは、「カラー」な測定技術が使用可能であること、すなわち、潜在的に毒性の染料もしくは固定剤を使用する必要がないことにある。

したがって、本発明によれば、高い空間および分光解像度を持つ分光生物画像法が提供される。この方法は、(a) 分光画像されるべきサンプルを調製する工程、(b) そのサンプルを光学装置を通して観察する工程、この光学装置は撮像分光計に光学結合されており、光学装置および撮像分光計は、(1) コリメート光学要素を用いてサンプルの全ビームから入射光を同時に収集し、(ii) コリメートされた入射光を多数の要素を有する検出素子系に通し、まず、光が干渉計内部で異なる方向に進行する2つのコヒーレント光線に分割され、次いで2つのコヒーレント光線が再結合されて互いに干渉して、検出素子が形成されるようにし、(iii) 出射光線を出射要素の2次元アレイを有する検出器上に出力し、光線を受光させる受光素子系に通し、各検出器要素の各々がサンプルの1つの、全測定期間を通して常に同一のピクセルであり、サンプルの画像は検出器アレイ上で固定され、測定中のあらゆる時点で像は可能かつ

識別可能であり、各検出器要素は、異なる波長でピクセルから得られる光の強度の特定の一次結合である信号を生成するようにし、この一次結合は検出器要素の関数とし、(iv) 干渉計系の少なくとも1つの要素を回転し、干渉計系によって生成された2つのコヒーレント光線の間の光路差がサンプルの全ピクセルについて同時に走査されるようにし、(v) 配鏡装置を用いて各検出器要素の信号を時間の関数として記録し、データの第1のキューブを形成することによってサンプルの各ピクセルのスペクトルを得るためのものである。および(c) 数理解アルゴリズムを用いて第1のキューブを解釈する工程を含む。この方法はさらに (d) 解釈されたデータのキューブをワビングする工程を含んでもよい。光学装置は上述のいずれのものであってもよいが、これらに限定されるものではない。コリメートされた光はサンプルの透過光、反射光、散乱光、もしくは発光光とすることができ、サンプルの発光光は発光されたプロローグの光、発光とされたプロローグに誘導された光、もしくは自然発光とすることができ、光はいかなる状態に由来してもよく、例えば、レーザー、白色光、透過光、紫外光および/もしくは小さな波長範囲を有する光等、いかなる型のものであってもよい。光は複数の光源に由来するものとすることもでき、光源は同時にまたは順に作動させることができる。二次元アレイはビデオ後のCCD、希薄層ダイナミクスレゾリューション、増幅CCDもしくは時間増幅CCDとすることができ、サンプルは、細胞、組織、もしくは全生体等、あらゆる生物学的サンプルとすることができ、ヒトを含むいかなる種に由来するものであってもよい。細胞はバッチ法で収集された細胞、血球、胎児細胞、悪性の疑いがある細胞、分裂間期の細胞、有糸分裂中の細胞もしくは減数分裂中の細胞を含むいずれの型の細胞であってもよい。組織は、腸の組織、脾臓、血液、皮膚、角膜、毛髪、筋、骨、肺、膀胱、精巣、前立腺、腎臓、動脈、静脈もしくは心臓を含むいずれの型であってよい。

さらに、本発明によれば、サンプルは細胞、組織切片もしくは生体とすることができ、光はプロローグによって誘導され、プロローグは特定の細胞成分に結合するものとする。本方法はその細胞成分の存在もしくはレベルを検出するためのものとなる。プロローグは非発光光線を含むことができ、誘導されるのは蛍光発光線である。プロローグはさらに、デオキシリボ核酸の蛍光線および/もしくはリボ核酸のような核酸分子を含んでもよく、この場合、本方法は細胞の核酸分子とのハイブリッド化の存在もしくはレベルを検出するために用いられる。また、プロローグは抗体を含むことができ、この場合、本方法は、抗体によって認識される細胞マーカー質の存在もしくはレベルを検出するために用いられる。蛍光発光は生物学的用途に用いられるいかなる蛍光発光であってもよく、当業者は理解されるように、生物学的用途に用い

れる発光のいかなる蛍光発光系をさらに含んでもよい。

数理解アルゴリズムは上述のアルゴリズムから選択することができ、また、上述のアルゴリズムのいかなる組み合わせであってもよく、また、当業者は理解されるように、数理解アルゴリズムは分光画像を分析および/もしくは表示するのに適した現在既知もしくは未開発のいかなるものであってもよい。

本発明の方法はサンプルに発光された複数の蛍光体の分光的測定のため、例えば、制御されるものではないが、サンプル中の局所電位差、pH値および細胞内イオン(例えば、水素、ナトリウム、マグネシウム、亜鉛およびカルシウム) 濃度のようなミクロ環境変化を検出するため、サンプル中の薬液系、ポリイオンおよび/もしくは細胞質タンパク質のような天然成分からの自然発光を測定するため、サンプル中の少なくとも2つの蛍光体の空間分極を測定するための蛍光共鳴エネルギー転送を測定し、例えば、制御されるものではないが、サンプル中の細胞の技術的クロマチン機構の型のような細胞および細胞下細胞を同定かつワビングするため、時間の関数としてサンプル中の全生命過程をモニタするため、インジケータの染色体-セントロメアを含むインジケータマーカーダイナミクスにおける蛍光のため、および細胞分類のために用いることができる。

次いで、上記の説明と共に本発明を示す以下の実施例を参照する。

#### 実施例1

類似性ワビングアルゴリズムを使用し、膜を穿たれたゾクリラムシの胸にセイルの分光画像分析この実施例は、細胞の生命サイクルの異なる時点で数個の分光キューブを測定し、各試験時において、細胞中の特定の化学物質もしくは器官の位置を類似性ワビングで強調することによって行われる分光画像が、いかに細胞の生命過程を明らかにするかを示すものである。したがって、これは、時間の関数として、細胞の小器官の間の運動もしくは化学的変化、エネルギー交換、もしくは代謝反応を明らかにする。本発明および生命過程の研究に理想的であるのは、高い解像度および感度で測定を行うことにより、細胞および組織を特徴づける小さな化学変化を容易に追跡することができ、これらの変化は生命過程自体に関連しているからである。

図11a-dはゾクリラムシ (*Parametis vulgaris*) の4つの別個の細胞部位 (すなわちピクセル) における薬液の2つの異なるスペクトルを示すものである。蛍光顕微鏡 (オリンパス社製 RRC) に取り付けられたセントロメア-ゾクリラムシを使用して生体ゾクリラムシを分析し、ゾクリラムシ細胞は緑色光源 (バンプス極大465nm) で励起し、赤色蛍光をこのシステムで測定した。スペクトル1および2は630nmおよび695nmにおける蛍光ピークがわずかに異なっていることが認められる。これら2つのピークの相対強度はスペクトル3~6に示され

る。図12aは細胞内の局在性の関数として変化する。ゾクリラムシ環境された膜の未加工の薬液系自然蛍光を図12aに示す。ゾクリラムシ細胞質中にはわずかに赤色薬液系蛍光強度の変化しか認められない。上記の類似性ワビングアルゴリズムを使用することにより、ある程度の分光像を示す細胞構造を表示することが可能となった。他のすべてのピクセルとの比較の基準となる。ゾクリラムシ細胞 (図11a) の周辺および中心から選択された5つのピクセルの蛍光スペクトル、およびその結果を5つの異なる強調画像で示す。これらスペクトルの各々は類似性ワビングによって他のすべてのピクセルスペクトルと比較した。これらの結果を図12b~fに示す。

図12bに示すように、図11aのスペクトル1を参照として用いる類似性ワビングにより、ゾクリラムシ上部に2つの別個の (白い) 領域が明らかにされた。これらスペクトルは高い含有量の天然薬液系を示し、したがって、おそらく細胞膜頭および細胞基底を示すものである。図12cに示すように、図11aのスペクトル2を参照として用いる類似性ワビングにより、細胞膜頭および細胞基底が明確に示す。移動速度を示す各々約1ピクセルの小さなマーカーが明らかにされる。図12dに示すように、図11bのスペクトル3もしくは4を参照として用いる類似性ワビングにより、細胞質の中間部に、630nmの低いピークによって特徴づけられる、減色した減かなる大きな濃縮が明らかにされた。図12eの画像は図11cのスペクトル5を参照として用いる類似性ワビングによって得られたものであり、図12dのものと同様の区間に、ほぼ同一の650/695比を示す狭く限定された濃縮を明らかにした。図12fの画像は、外周系近側に大きな領域を示しており、これはおそらく消化された老廃物が細胞から除去される細胞肛門を示すものである。このような細胞は天然薬液系の含有量が最低であり、フエオプテイン含有量が最大である。

図13は交配する2つのゾクリラムシの葉肉細胞に生息する寄生生物の赤色蛍光スペクトルを示す。スペクトルおよび下部の濃縮は、それぞれ、結合するゾクリラムシの上部および下部の濃縮に由来する。これら2つのスペクトルは約630nmピークおよび低い695nmピークを示す。増大した695nmピークを有する同一のスペクトルが、葉肉細胞のあらゆるピクセルにおいて、細胞中のいかなる部位も分光変化させることなく、記録された。図14aは図13のスペクトル1を参照として用いて、交配するゾクリラムシの葉肉細胞および天然薬液系含有量の類似性ワビング画像を明らかにする。ゾクリラムシの寄生交配は、一般に体の口腔領域に付着するタイプ1およびタイプ2の2つの交配細胞の付着によって始まる。図14bに



マツンの染色体アレーへの漸進的融合を解明した。この分光撮像方法は融合された染色体アレーおよびそれらの境界の微小な変化を強調するのに理想的である。初期および後期が芽球の高度に融合されたクロマチン標本の軌い境界は他の核質とは特異的に区別された(図1)および(10)。これらの構造は個々のまたはグループ化された染色体の特異的機構に対応する可能性がある。

スベクトラキエーを本発明の方法と組み合わせる使用することにより、このように、健康な組織で起こる発局的変化をモニタすることが可能になった。また、様々な癌性腫瘍は独自の発局性によって特徴づけられるため、スベクトラキエーシステムおよび本発明の方法を用いてこれらの特徴をモニタし、したがって、例えば、このような癌性腫瘍の(例えば存在および発症)早期診断することが可能である。

#### 実施例3

黒色腫の5-アミノレブリン酸を介した光力学療法：類似性マツピンダルゴリスを用いたマツピンダラキエー分光撮像システムによって測定された光増感剤相互作用

癌性黒色腫の光力学療法 (PDT) は部分的にしか理解されていない [Marcus (1992), Photodynamic Therapy - Basic Principles and Clinical Applications, Hemisphere Publishing Corporation, Marcel Dekker, New York, 219 ~ 268 ページ]。腫瘍の着色の強度と進行の程度との間に強い相関が認められ、明るい腫瘍は暗い腫瘍よりもはるかに良性である [Nelson et al (1988), J. Nat. Cancer Inst., 80, 56 ~ 60]。ヒトの着色された黒色腫はPDTには満足に反応せず、(例えば虹彩の)メラニン色素性黒色腫が陽性に反応すると結論づけられた [Favilla et al (1991), Br. J. Ophthalmol., 75, 718 ~ 721]。一方、皮膚癌に対して5-アミノレブリン酸 (ALA) 誘発PDTの結果 [Malik et al (1987), Biol. Cell, 60, 33 ~ 40] は黒色腫PDTの発局に新たな可能性を開いた。白血芽細胞中で天然前駆体5-ALAから生成されたプロトポルフィリン (PP) は、たとえ低光量でも癌細胞破壊のための効果の高い光増感剤であることが示された [Malik and Luggett (1987) Brit. J. Cancer, 56, 589 ~ 595; Malik et al (1989), J. Photobiol. Photobiol. Photocchem. B, 4, 195 ~ 205; および Uthmanli and Malik (1992) Cancer Lett., 65, 127 ~ 131]。5-ALA-PDTはヒトに適用して、特に癌細胞腫瘍のような皮膚癌ならびに内臓癌性腫瘍の選択的治療に成功した [Peng et al (1992), Int. J. Cancer, 52, 433 ~ 443]。同所的な5-ALA-PDTの適用もしくはその全身系注射は腫瘍の固定およびその光増感の双方において高い選択性を示すことが示された [Kennedy and Rottier (1992), J. Photocchem. Photobiol. B, 14, 215 ~ 222; および Peng et al (1992), Int. J. Cancer, 52, 433 ~ 443]。これらの結果は急速に分裂する癌細胞にお

ける周囲の正常組織に比べて顕著に高められたPP生成および蓄積に直接起因するものである。5-ALA-PDTは選択的腫瘍治療のための安全かつ強力な道具であると考えられており、その目的の1つは黒色腫用にそれを開発することである。B16黒色腫細胞におけるPP生成の制御は、効果的な光力学療法を容易にするためのプロトポルフィリンの化学的誘発剤によって顕著に増強されることと示された [Malik et al (1987), Biol. Cell, 60, 33 ~ 40]。

本実施例で明らかにしたのは、外因性PPによる治療に比較した、内因性PPを蓄積する単一の細胞上での主要な光化学過程および光力学的反応である。PP蛍光の分光像分析によって、1つの細胞における多数のピクセル変化が明らかになり、少なくとも100×100 (すなわち10,000) の異なるスベクトルが単一の細胞から得られた。分光撮像および類似性マツピンダラキエーを用い、以下に示すように、単一細胞中の点分光変化および細胞間光増感効果の位置を見出すことが可能であった。

この目的で、ネズミ黒色腫細胞、ラインB16/ローンF10を、10%フコシリン血漿および抗生物質を添加したRPMI-1640培地 [Malik et al (1987), Biol. Cell, 60, 33 ~ 40]、組織培養プレートもしくはガラスマツナス (Thermanox) カバー片 (Nunc, Naperville IL) で、5%のCO<sub>2</sub>を含む温気のある37°Cの雰囲気中で培養した。移行后再培養した、黒色腫B16細胞における内因性PPの刺激法は (1) 誘発段階およびそれに続く (2) 生成段階からなるものであった。誘発期は細胞をDM50で48時間処理することによって達成し、これに続いて、段階 (2) すなわち5-ALA (0.3mM) との血漿中で培地中の24時間のインキュベーションを行った。5-ALA-培地のpH7.0に調整した。段階 (2) 後、細胞はペレット化し、PBSですすぎ、ボルツァリピン抽出を下記のように行った。外因性ボルツァリピンを用いた実験のためには、プロトポルフィリンIX (Sigma) を10%NaOHに溶解し、細胞懸濁液中で10mMで希釈し、24時間、黒色腫培地に添加した。両在化実験のためにフコシリンF10 (GLT) についても同じ処理を行った。

黒色腫B16細胞は上記のようにDM50および5-ALAの作用によってボルツァリピンを蓄積しており、これに対して320 ~ 460nm蛍光で短波長380nmのフコシリン (黒色光) 源を用いて1 ~ 6時間の照射を行い、20W/cm<sup>2</sup>とした。細胞は1 ~ 4μm/μmの光量で照射された。照明は量子ラジオメータ光度計J1-8型 (Lambda Instrument Co. TP, NE USA) によって測定した。

B16黒色腫細胞内の光増感中における内因性プロトポルフィリン (内因性PP) の細胞下層在化を本発明の方法によってスベクトラキエーシステムで分析した。黒色腫細胞はALAと共にインキュベートし、次いで、個々の生体細胞中の内因性PPの蛍光を3つのモードで記録し

た。これは (1) 従来の蛍光像、(2) 100×100ピクセルの蛍光分画像、および (3) 分光類似性マツピンダラキエーを行い、点マツピンダラ情報から画像を再構築することによって形成された処理画像である。図18aに示すように、生の蛍光像は細胞質溶の全域にわたって内因性PPの点分分布を明示した。内因性PP局在化のこのパターンはミトコンドリアおよびリソソームならびに内臓細胞質の蓄積を反映している可能性がある。これらの細胞内小器官は光増感の主構であることが示された。図19aは、それぞれ図18aに示した細胞の異なる細胞部位に由来し、各々1つのピークを650nm、もう1つのピークを705nmに有する4つの蛍光スベクトルを示す。これらの2つのピークの相対強度は、処理された細胞の細胞内区画における部位の位置によって変わるものではなかった。図19a (実験) に示す1つの蛍光スベクトルは図18aの細胞の1つの小胞から選択された。図18bの画像は、選択されたスベクトル (図19aの実験) を参照として用いた類似性マツピンダラで再構築された。図18dに示すように、再構築された画像は、膜および内腔蛍光の区分を明示した。図18dに示すように、1分間の光照射中に、細胞中の内因性PPは漂白され、蛍光強度は低下し、図19bに示す別の測定スベクトルは625nmおよび70nmへの左方向のシフトを明示した。これらの2つのピークの間の強度比は細胞中の部位毎に様々な状態を明らかにした。図19bの実験スベクトルを用いた類似性マツピンダラは、図18dに示すものと基本的に同様な、図18aに示す新たな像を形成した。図18eに示すように、長い照射間隔 (3分) の後に、細胞の蛍光像は顕著に影射を受けた。図19cに示すように、図18eの細胞の2つの異なる点から得たスベクトルは650 ~ 670nmに1つのピークを有していた。蛍光像 (図18e) および図18fに示したものは図19cの実験で示すスベクトルを参照として用いた類似性マツピンダラに由来した画像であり、鮮明な小器官構造は認めることができず、これは細胞破壊の結果であると考えられる。したがって、分光変化は2つの主図を示すことができた。その1つは光増感の最も可能性の高い結果としての細胞レベルでの光生成物の形成 [Kontig et al (1993), J. Photocchem. B, 18, 287 ~ 290] であり、他方、光照射中の局在化の可能性も排除できない。

異なる細胞下層区間で生成された、ミトコンドリアに蓄積された内因性PPは本実施例により、顕微鏡環境に保持されることが明らかにされた。光照射は2つの効果、すなわち、いくつかの光生成物の形成およびミクロ環境における変化を生み出した。酸水性、脂水性、酸度等のミクロ環境の光生成物形成に対する効果および蓄積 [Kontig et al (1993), J. Photocchem. B, 18, 287 ~ 290] は単一の生体細胞のミクロ蛍光分光法では分離することが困難である。

極めて異なる細胞内区画局在化が蛍光増感地において外因性PPでインキュベートした単一細胞内で可視化され

た。図20aは核周領域における外因性PPの蛍光像および特異的局在化を示し、これはおそらくミトコンドリアおよび核膜を標識するものである。また、蛍光は細胞質溶の他の部位でも認められ、外膜でもわずかに認められた。図21aに示すように、図20aに示した細胞の5つの異なるピクセルのスベクトルは、ピクセル毎に変化せず強度のみが異なる2つの固有な特徴的蛍光ピークを明らかにした。主蛍光ピークは670nm、他のピークは625 ~ 630nmに位置することが認められた。図20bに示すように、外因性PPの1分間の光増感により、即座の構造および再局在化が誘発された。中央に配置された外因性PPは核膜を取り巻く全般的な円形配置に変化した。4つの個々のピクセルに関する図21bに示すように、630nmは完全に消失し、蛍光は650 ~ 670nmにシフトした。4つの個々のピクセルに関する図21cに示すように、増感における追加の5分間の後インキュベーションによって、蛍光の部分的な回復が認められた。新たなスベクトルは異なる細胞下部位において2つのピークを630nmおよび70nmに示した。よって、これらの結果は、蛍光増感地に添加された外因性PPがエンドサイトーシスを介して誘発され、エンドサイトーシス-エンドソーム経路を通してゴルジ複合体に供給されたことを示す。エンドソーム局在化に關する仮説はスベクトルへの酸性pHの影響を示す分光分析によって支持される。ボルツァリピン蛍光スベクトルに関する影響に關する知見はポツチエ [Pottier (1990), J. Photocchem. Photobiol. B, 51, 6, 100 ~ 109] によって示された。外因性PPのいくらかは外膜に局在化する。光照射は黄色蛍光に影射し、外因性PPからの光生成物の形成を明示する。増感の後インキュベーションはスベクトルの点特性を消失させ、その後は核膜に特異的に局在化が認められた。顕著な分光シフトはより低酸性の環境でのがボルツァリピン局在化と光生成物形成を反映するものと考えられることもできる。分光像は単一細胞における細胞下分光変化を可視化および測定することができ、この方法は従来の細胞集団の蛍光分光法とは顕著に異なっている。したがって、細胞質小器官の微細な分光シフトおよび光生成物の局在化を本発明の方法で明らかにすることができた。

#### 実施例4

細胞における葉緑素のミクロ分布に対する葉生生物の影響および蛍光分光撮像によるその検出  
遊離性 (リーフビルディンガ) サニンはその組織に結合毛織と呼ばれる内臓葉緑素を溶在させている。幹毛織はその光合成物を宿主サンビに寄与し [Muscettine et al (1989), Proc. R. Soc. Lond. B, 263, 311 ~ 324; Lewis and Smith (1971), Proc. R. Soc. Lond. B, 178, 111 ~ 129]。後者の非遊離性を溶解無機葉緑素として吸収することができ。ムスカチンおよびデリリ [Muscettine and D'Elia (1978), Limnol. Oceanogr., 23, 725 ~ 734] は遊離性サンビにおけるアブノーマルの吸収および保持が光によって

増進し、これは鞭毛藻による同化を示唆することを示した。アゾモニウム塩の变化は鞭毛藻の集団密度に影響を与える [Muscante et al. (1989), Proc. R. Soc. Lond. B 236:311~324]。バクテリム (Brythia) (1988), Proc. 6th Int. Coral Reef Sym. Australia, 2:535~540] は鞭毛藻によるアゾモニウムの正味採取があること、およびアミノ酸の同化によって分解されたあらゆるアゾモニウムは共生の腸管内で再利用率に達しないことを明らかにした。彼は鞭毛藻の入手可能性が低いことによってこの腸内の生産性が著しく削減されたことを示唆した。

鞭毛藻はその動物宿主の活性によって生成される遊走およびリッパに富んだ排泄物をいくらか獲得する [Johnannes et al. (1970), Limnol. Oceanogr. 15:579~586]。アゾモニウムの内部循環は関係の遊走要求のいくらかを供給する。この遊走保存および回収方法は栄養素水中での生存に不可欠である。しかしながら、回収は損失を防ぐみに過ぎず、成長および再生に必要な付加的な遊走を供給するものではないため、これらの要求を満たすためには外部供給源も必要となる。

鞭毛藻の集団密度は栄養供給によって制限される [Hoeft-Guthberg and Smith (1989), Mar. Ecol. Prog. Ser. 57:173~186;およびCook and D'Elia (1987) Symbiosis 4:199~212]。サンゴと密接に関係して生息する共生生物も異化遊走を関係に与与することができ、それら近傍の鞭毛藻密度の増加を招く。メイヤーおよびシュルツ (Meyer and Schütz (1985), Limnol. Oceanogr. 30:157~166) はサンゴ頭上に滞在する魚がその排泄物で栄養レベルを増加させることによって組織のバクテリアおよび鞭毛藻密度を増加させる可能性のあることを示唆した。

また、サンゴは様々な無脊椎動物を滞在させており、そのいくつかは定着性であるサンゴ骨格に付着しており、他は内部に居住するかサンゴ組織および骨格に覆い被さっている。サンゴに生着するカニであるクリノトラリス・コラリイデス (*Cryptochinus corallicolus*) は巨大なサンゴ骨格中のくぼみに見出され、イヌラエリ虫イナトのフグイイダエ (*Faviidae*) サンゴに一般的なものである。ポッツ (Potts (1915), Papers from the department of Marine Biology:33~69) はこれらのカニの形態およびそれらのくぼみについて記載した。しかしながら、カニとその宿主との関係の本質は不明である。サンゴ共生体はそれらの排泄物を、鞭毛藻を含む近隣の藻に寄与することができるとも示唆される。

ビルガバチナエ (*Pygmatinae*) サラフアミリーを構成するフジツボはサンゴの組織共生体である。何人かと著者はサンゴとこの間で物質の交換があると主張しているが、そのような関係は未だ確認されていない。クック等 [Cook et al. (1991) Hydrobiologia 216/217:286~290] はフジツボ (*Savignium nilliporum*) から排泄されたリッパをその宿主 (*Millipora dichotoma*)

の鞭毛藻によって吸収されることを示した。

イガイ目 (*Lithophaga*) は生体サンゴの骨格内に潜伏する [Mannan (1980), Reef. J. soil. Stud. 46:13~54]。これらの生体サンゴ骨格を成長用貯蔵所として用い、その上の地から濾過によって食物を採取する。また、アストロガラ・ミリオケラ (*Astropera mriophthalma*) に生息するリトファガ・ソニアソリス (*Lithophaa simpsoni*) によって排泄されるアゾモニウムが宿主サンゴの鞭毛藻によって吸収されることが示された。

したがって、共生的宿主生物の排泄物が周囲環境を富栄養化するものと推測される。これは、葉緑藻濃度の増加によって示される共生体近傍における高い鞭毛藻密度を招くものである。このような微小な距離において藻の密度を測定することは困難であり、知られている限りにおいて、この距離内での変化は明らかになっていない。

本発明例は、この問題を実験的に解消することのできる本発明の方法の使用を記載するものである。すなわち、スベクトルキエーアソニウムを用いて、小領域での葉緑藻濃度変化を検出する。

葉緑素分子が光で励起されると、自然蛍光として知られる過程によってフロントが解放される。分子から蛍光によって励起された光はその励起エネルギーも赤く、波長の違いは振動エネルギーの損失を示す。生体内での葉緑素の蛍光増光スベクトルはその主峰を685nm付近に有する。多くの光合成色素が溶液中で蛍光を示すことが知られているが、生体内では葉緑素の蛍光が支配的である。なぜなら、他の色素はそれらの吸収したエネルギーを比較的高い効率で葉緑素に転送するからである。この蛍光の測定は葉緑素の検出および見出しのための手段を提供する [Kirk (1983), Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, Cambridge University, Cambridge, 401~ページ]。365nmもしくは405nmで励起される光と、制御動物組織はそれらの組織中の蛍光物質により、異なった波長で発光する。しかしながら、650nmを超える波長の蛍光は鞭毛藻中の葉緑素である [Hazel (1985), Mar. Ecol. Prog. Ser. 120:185~191]。ハーディ等 [Hardy et al. (1992), Mar. Ecol. Prog. Ser. 88:247~255] は、可視光線に先だてて葉緑素濃度の現象を明らかにするために葉緑素蛍光を測定した。

この目的で、エイラートのインテグレーション・インシステムエートの前の虹彩で材料を採取した。以下のサンゴおよびその動物を蛍光分析に用いた。すなわち、フグイデス・ハリコラ (*Favites halicora*) とアカニ (*Cryptochinus corallicolus*)、ゴニオスレ・レチアホルミス (*Goniastrea retiformis*) とリソファテア・レンセツア (*Lithophaea josselyn*) フーガ・レンセツア (*Lithophaea dichotoma*) とフジツボ (*Savignium nilliporum*) である。サンゴは葉緑

素に運び、通気した海水中に保持した。すべての測定は採取2日以内に行った。鞭毛藻はリオーダービツ (*Paetelia*) でサンゴから分離した [Jomanaes et al. (1970), Limnol. Oceanogr. 15:579~586]。

分離した鞭毛藻の蛍光分光強度は、薄片蛍光顕微鏡に取り付けたスベクトラキエーアソニウムで行った。分光類似性アソニウムは、各蛍光アソニウムからの比較的高率のビクセルを選択し、次いで蛍光アソニウム中の他のすべてのビクセルをこのビクセルと比較することによって作成した。選択されたビクセルに類似した蛍光強度を有するビクセルは明るいビクセルを呈し、他のビクセルの類似の程度はビクセルの陰影で表現される。

生体サンゴの分光強度は、サンゴを海水中に配し、接写レンズを取り付けたスベクトラキエーアソニウムで観察することによって得られた。サンゴは2500のオリエン・キセノソニア (*Oriel Xenon Lamp*) で照明した。380nm~680nmの広帯域励起光 (バイツ・ショット (Schott) i) の励起フィルター (80-39) を用い、そのフィルターは光源とサンゴとの間に配置し、590nmの蛍光フィルター (バイツ・ショット社) の60-69) をサンゴと分光強度カメラとの間に配置した。

サンゴ上の各ビクセルで得た葉緑素蛍光強度は特定部位の葉緑素濃度およびその葉に依存する。サンゴの表面の接写は励起および蛍光の強度に主要な影響を与える。この影響を除去するため、各ビクセルの励起強度を系列の最高励起強度に調整した (スベクトルの励起正規化)。トラッセクトは共生動物を横切るように画像に沿って描出した。各ビクセルの励起および発光強度の強度を測定した。処理に沿っていれかみの赤色蛍光ビクセルを選択し、これを他のビクセルと比較することにより、コンピュータプログラムは、トラッセクト (X軸) および蛍光強度 (Y軸) に沿った波長 (Z軸) の連続して正規化された3次元分光表示を作成した。この3D表示はトラッセクトに沿った相対蛍光強度を、励起に対する地理的影響による補正と共に示した。

ビクセルは共生動物に隣接する画像上でランダムに選択し、4つの連続的なビクセルを追加した。各系列で、第1および第5のビクセル間の距離は2.4mmであった。各ビクセルの発光と励起との比は相対蛍光指標 (RFI=発光/励起) として定義した。5つの連続的なビクセル毎の正規値は、同一系列中の最高励起のビクセルに相対付けることによって再び正規化し、各5ビクセル系列の相対値を得た。

鞭毛藻の蛍光スベクトルを測定するため、2つの分離した顕微鏡を用いた。図22に示すように、2つの鞭毛藻の蛍光アソニウム上の3つのランダムなビクセルの分光曲線は671nmで葉緑素蛍光ピークを示す。

共生体を支持する3つのサンゴを分析した。図23a, 23bおよび23cは正規化前の3つの宿主の多ビクセル蛍光アソニウム、および分光分析に用いた処理を示す。トラッセク

トは共生体を横切った。図23b, 13dおよび23fは上記のように正規化された654nmおよび685nmの範囲における相対強度蛍光を示す。極大発光は670nmにあり、葉緑素aに典型的なものであった。フグイデス・ハリコラ (図23b) ではくぼみの周囲で最高蛍光強度が認められ、トラッセクトがくぼみから遠ざかるにつれて蛍光強度が低下しており、くぼみ周囲での高い葉緑素濃度を示している。しかしながら、くぼみ自体からは発光がなかった。ゴニオスレ・レチアホルミスおよびミリアボラ・ディコト (それぞれ、図23dおよび23f) ではトラッセクトに沿った明確な蛍光パターンはなかった。イガイのサイホッ領域およびフジツボの開口部からは発光がなかった。

図24a-cは数種の放射状トラッセクトに沿って等間隔で見出される9~11ビクセルの平均値の分析結果を示す。値は共生体に隣接するビクセルに対する相対値である。回帰曲線 (点線) も示す。フグイデスおよびクリフトホルス (図24d) の場合にのみ、明確な蛍光勾配が検出された。

図25a-cに示すように、3つのサンゴに対して分光類似性アソニウムを構築し、上述のように、類似性アソニウムのためのコンピュエーアソニウム法は単一の選択された特徴的スベクトルを元の画像を構成する残りのスベクトルと比較する。これは、参照アソニウムと他のすべての間の差を計算することにより、図25a-cに示すような分光類似性を有する新たな画像を作成する。最高RFI値を有する最高相対蛍光スベクトルを選択して分光類似性アソニウムに使用した。図26はカニのくぼみ周囲の高い葉緑素濃度を強調する。ゴニオスレ・レチアホルミス (図25b) ではイガイ (4mm) のサンゴ近傍により高い傾向があるが、これは相対蛍光強度の傾向トラッセクト (図23d) では明示されなかった。ミリアボラ・ディコト (図25c) では、共生体 (3mm) 近傍で所在化された葉緑素蛍光の類似したパターンがあり、これは主として、フジツボの血を被覆するトラッセクト組織上に存在する

が、図25bに示すゴニオスレ・レチアホルミスではより不明瞭である。

したがって、本発明例では、本発明の方法を用いた、無脊椎動物共生体を支持する3つのサンゴ種における葉緑素蛍光分布が示された。これらの結果は共生カニ (*Cryptochinus*) のくぼみ近傍に高濃度の葉緑素aを示す。トラッセクトに沿って顕著な葉緑素減少がある。この場合、葉緑素濃度の変化は葉緑素濃度の変化に起因しない。くぼみ周囲の高い葉緑素レベルは有蹄類に由来するものであり、これらの藻はくぼみに存在する支配的な藻群である。ゴニオスレ・レチアホルミスおよびミリアボラ・ディコトの場合、共生動物の葉緑素濃度の違いによる顕著な違いはない。しかしながら、分光類似性アソニウムによって、ゴニオスレ・レチアホルミスおよびミリアボラ・ディコトの場合にも鞭毛藻の変化を抽出することが可能になった。類似性アソニウムの利点は一

度にはツブ中の全ピクセルが比較可能なことにある。すべての共生体はその排泄物によって周囲の環境を富栄養化させることができる。フグアゲハ、ハルミコラの場合、栄養が排泄物に対して青緑藻は限毛藻と拮抗し、したがって、共生体の周囲の栄養的な性質であると考えられる。フグアゲハ・レチフォルミスおよびレチアボラ・デニソトピア・レチフォルミスおよびレチアボラ・デニソトピアの場合、限毛藻の増殖は共生体に影響を受ける。フグアゲハ・レチフォルミスおよびレチアボラ・デニソトピアにおける共生体の定量的影響の違いは、共生体の方法およびそれらの宿主サブゾンの形成の違いによるものである。共生動物のそれらの宿主サブゾンに対するこのような影響が報告されたのはこれ以前めてである。

よって、本発明の分光顕像方法の適用はこのような変化の識別を可能にした。これらの方法における表面領域からの蛍光を測定し、これをその位置における顔料濃度と関連づけることを可能にする。解像度は使用される光学系の倍率のみに制限される。分光顕像分析は10°を越える他ビクセルスベクトルを生成し、これらのスベクトルを用いたアルゴリズムに対し、選択された色料群を可能にした。この実験的な系に代り、選取領域から蛍光測定は、限定されたレーザの分光情報を明らかにすることが通じき。分光ソートピッチおよび再構築をすることはできない [Gore et al (1983), J. Photogram. Phototech. B 20:23-35]。

5) 本発明の方法のうち1つの利点は、細胞中の顔料を決定する分光的方法の多くは破壊的であり、検定測定は通常培養液中での抽出後に行われるのに対し、本発明例に用いられた方法は生体内での顔料測定を可能にしたことにある。サンプルでは通常、フローターピッチを用いて組織を除去し [Johnannes and Wiebe (1970), J. Microscop., 15:822-824]、抽出液、分析を行う。フローターピッチを用いて組織を除去することにより、小さなサブピッチ表面領域の検査ができなくなり、サンプルの空間的境界は不明瞭になるが、本発明の方法を用いれば、サンプルは無傷のままであり、測定値が本来に戻すことができ

### 实施例5

スペクトラキユーブおよび一次結合アルゴリズムを用いた、改良された蛍光インシチュハイブリダイゼーション (FISH)

本発明の方法は粗分含されたスベクトラキエーゾシステムを用いた分光生物検量は、1回の測定で高精度に、多数のプロローブの同時検出を可能にすることによって、FISHの有用性を高める。この結果、FISHによる遺伝子異常の検出における効率および信頼性が大幅に向上する。

上述のように、蛍光インジカヘイタリダイゼーション(FISH)は多くの研究および診断分野において重要性の増大する役割を果たしている。70年代におけるその導入開始以来、FISH技術は顯著に進化し、単一遺伝子配列、部分的染色体配列および全染色体(すなわち染色体

ベインディング) さえの検出および同定を可能にした。FISHの多くの用途は、病気の早期検出から、遺伝子病および異常を発見してその後に対策する出生前診断、体細胞異数性診断等にまで及んでいる。

相同の収縮配列のヘプタリグランドセーモンに基づくFLNとSHの強い感受度および選択性により、たまたまキロペーナス (1b) という短い配列であっても観察可能である (そして、これはおそらく時と共に改善され、15~30ヶ塩基ペアでいう短い配列の出現まで可能にし、この結果、点突変異の検出も可能になるであろう)。FISHとDM、フロー、蛍光染料、蛍光顕微鏡法、高性能CDメノウなどの検出技術の改良と共に改良されている。

多数のクローンを同時に検出する能力はすでに文献で

FIG.1は、効率的な診断器具とするものとして示されている [Mucklin and Scoller (1977), *Nature*, 265, 172-173]。しかしながら、従来の方法は面倒であり、使用が困難である。以下に例示するように、適当なアルゴリズムと組み合わせたソフトウェア・パッケージ・システムによれば、その分光解像度および感度によって、多数のフローの検出が大幅に改善される。この能力を例示するた

め、図26a～cを参照する。これらは、蛍光体デキサス

レッドおよびローダミンで標識された染色体1および染色体2に特異的なDNAプローブを用いて行った間期FISH 測定。1の例を含むものであり、その蛍光スペクトルは極めて類似している。染色体1、その染色体のサテライト領域のためのミトサテライト・プローブであり、チキサンレッドで標識されてピチオシン後ハニグド・ゼーションを介してDNAプローブにリソソシアしていた。

染色体17pロートは染色体の動原体領域のためのαサチライトプロローグであり、ローダミンで標識されてデラフィキソニウム後ハナトリリタドを介して第2のDNAアトローにリソソームに結合していた。図26aは元画像を顕微鏡を通して眼に見せる状態で示し、図26bは元画像をサンキュートシステムで測定および処理した後の同一のサンキュートを示し、図26cはデキサスレソト(T)およびローダミン

ン(R) 蛍光体の蛍光スペクトルを示す。

図26cに示すように、デキサスレツトおよびロードミンの分光ピークは15nmしか相違せず、したがって、フリルタに基づく系を用いてこれらを区別することは極めて困難であろう。

図26bに示す顕微鏡を通したカラーFISH画像を観察すると、正確な数のドット（1〜4で示す）の認識および画像に現れるブローヤ型の信頼度は特に高くはない。一方、図26bに示すように、スベクトラキョウジシステムは各スベクトルに対して測定されたスベクトルを利用する

るものであり、ドットが存在を確かめ、これらを正確に計数し、異なる対をそれらの間小さな蛍光差によって高倍頻度で識別することができる。テキサスレッドおよびビロダミン蛍光の人工着色によって、図26cに示すように、フローに特異的な蛍光の位置を高精度に決定す

ることができた。すなわち、ボット1および2はデキヤスレツトのものであり、ボット3および4はローダミンのものである。

図27a~bは6つのアロゾームを用いた、簡便における技術的なハニアリタインゼクション後のFISH測定1例である。図27aは元画像を示し、図27bはすべての検出されたアロゾームをトリミングして、分光処理および人工着色プロセスを示し、図27aは、分光処理および人工着色システムを用いる3重ジロイックアルカドを通して検出された、ハニアリタインゼクション後の6つの染色体のセット（染色体によって8,10,11,17およびXとY染色体）を示す。（蛍光染色は、2つのDraGFPおよび染色体の詳細については、後述の表2およびOrhana Corp. Pat. No. 615002の記載を参照された。）

図2.7は同様の箱庭絵の元RGB画像を示すものであり、これから、肉眼でも、あるいは単純なRGBカラー測定を用いても、色を互いから識別することは困難であることが明らかである。熟練した観察者でも最良の場合に6色のうち、3色を検出できるに過ぎない。しかしながら、図2.7は、バックグラウンド・サトララクションおよび

分類（図6を参照）のための独自の分類アルゴリズムで分光データを処理した後の、図7aに示したものと同一のサンプルを示し、この結果得られるプロットは以下のように入色で強調された。すなわち、茶-B1:ソラモン-C:青一配:黄一B:緑-6:および赤-A7であり、背景には入色で強調された黒-B3を付与し、調整されるように、6対の蛍光体すべてが見え、対角主を容易に識別することができる。

さらに、青 (B2) で強調された 1 対は肉眼もしくはカメラの使用では殆ど見つけられないが、分光立方体上でバツググラウンド・サートラクション・アルゴリズムを適用した後には検出された (図 27a と 27b とを比較された)。

使用されたブローチは染色体8, 10, 11, 17およびxの動原体領域用の5つのαサテライトブローチ、および染色体1のサテテロマー領域用のミッドサテライトブローチである。上記染色体の各々およびDAPIカウント染色 (blue) を標識するために使用した蛍光色、それらの発光ピークおよび人工的なダイスプレイ色の分類を表2にまとめると、

表2

染色体	蛍光体	蛍光ピーク	ダイスプレイ色
8	SpectrumOrange TM 1	568 nm	茶 (B 1)
10	SpectrumGreen TM 1	538 nm	シヤレ
(C)			
x	Aqua 1	480 nm	青 (B 2)
1	Texas-Red 2	615 nm	黄 (Y)
17	FITC 3	525 nm	緑 (G)
11	Texas-Red 2 + FITC 3	615, 525 nm	赤 (R 1)
backg.	DAPI 4		黒 (B 3)
1	Vysis, Downers Grove, IL, U.S. から製造されたジキシグニシトとして得られるもの。		
2	フローラを含有する予めハイブリダイズしたジキシグニシトと抗ジキシグニシト抗体を介して結合したもの		
3	フローラを含有する予めハイブリダイズしたジキシグニシトと抗ジキシグニシト抗体を介して結合したフルオレセイン-5-イソチオシアネート		
4	カラクタ染色に用いられる4'，6-ジアニジノ-2-フェニリン-1-ホル		

図26に示した6つの蛍光体の各々の正規化された分光シグネチャから、数個の比較的低い蛍光強度で測定を行うリアルタイムシステムでは、スペクトル同士が大きく重なり合っているため、異なるフローラ種を識別することは不可能であることが明らかである。このようなシステムは、各フローラの強度の絶対的測定により依存し、したがって、バックグラウンド信号およびノイズにより影響される。さらに、細胞自体に由来する自然蛍光でも分光の重なりが生じることに留意された

多くなる、異なる外観を呈することになる。しかしながら、フローラの化学的組成の小さな変化により、第2の蛍光スベクトルは第1のものからわずかにシフトしている。スベクトラキエーションシステムは、その分光分解度および感度により、この影響を解消することができ、同様な影響は、サンプル調製中に充分に洗浄されなかったフローラについても存在し、異なる患者の診断に寄与する。したがって、本発明の方法と組み合わされたスベクトラキエーションシステムは、異なる診断の起こる危険性を低減することを可能にするものである。

多数のもしくは類似した染料に一般化して、図26aおよび26b-cの例は、多数のフローラを抽出および識別することが可能であること、および、それらの間に小さな分光差が存在していれば、スベクトラキエーションの測定でそれらを抽出かつ同定することを示している。

当業者には、他のおよび/もしくは既知のおよび未発見または未開拓の蛍光体および蛍光体の組み合わせを上述の様々なFISH用途に使用して多数の部位を同時に抽出したり、各染色体の各型を特有の色で染色したりできることが明らかである。従来の細胞および分子生物学で使用される蛍光体のリストは、Rastan (1993), Introduction to Fluorescent Probes: Properties History and Applications in Fluorescent and Luminous Probes for Biological Research, Macmillan, Academic Press社, London, 24-31ページに見出される。また、例えば、生物発光および化学発光のような他の標識法ならびに非蛍光標識法も同時に適用できることが当業者には明らかである。

したがって、FISH分析にスベクトラキエーションシステムを使用することによって、以下のような主要な利点を得ることができる。スベクトラキエーションシステムはその高分光分解度によって多数のフローラの同時抽出を可能にするのに対し、従来の手段を用いて(例えば顕微鏡を用いて) FISHを行うと、1回のハイブリダイゼンションに使用されるフローラ数が2〜4に制限される。したがって、FISH分析にスベクトラキエーションシステムを使用することによって、労力および時間が節約される。さらに、FISH分析にスベクトラキエーションシステムを使用すると全分析に少数の細胞しか必要でなくなるが、これは分析すべき細胞の数が限られている場合には重要な特徴である。

#### 実施例6

スベクトラキエーションシステムを使用した糖尿病診断  
糖尿病性網膜症は慢性的視覚障害であり、多くの場合、失明を伴う。治療で制御することができ、[Ferris (1993), (解説) JAMA 269:1290-1291]。

米国眼科学会は患者が治療されるべき臨床的状態を向時進行させたかを検出するクリーニンングシステムを示唆した [Diabetic Retinopathy: American Academy of O

phthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, Cal.; American Academy of Ophthalmology Quality of Care Committee Retinal Pains, American Academy of Ophthalmology, 1989]。

しかしながら、示唆されたクリーニンングシステムは高価であり、また、ある個人にとっては、患者は時折クリーニンングされた検査の間に深刻な網膜症を進行させることもあるため、現在の高価なクリーニンングでも充分ではない、それにも関わらず、クリーニンングは費用効率が高いことが示されている [Javitt et al (1989), Ophthalmology 96:265-64]。この研究は、危険性の高い患者と低い患者をより効果的に同定できれば、健康管理追跡検査にかかる大きな金額が節約できることを示している。したがって、糖尿病性網膜症のスクリーニングの精度を向上し、それにかかる費用を低減することのできるあらゆる方法は臨床的価値の高いものとなる。

現在、糖尿病性網膜症のためのスクリーニング評価として推奨されているものには、詳細な網膜写真および、選択された場合におけるカラー網膜写真が含まれる [Diabetic Retinopathy: American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, Cal 1; American Academy of Ophthalmology Quality of Care Committee Retinal Pains, American Academy of Ophthalmology, 1989]。網膜のフルオレシニン血管造影法は現在日常的に行われているが、侵略的で、不快なものである。時には死を招く。さらに、フルオレシニン血管造影法で得られる付加的な情報は患者を即座のレーザー治療のリスクを受け得るものとなってしまうものと分類するわけではない [Ferris (1993), (解説) JAMA 269:1290-1291]。

本発明によれば、スベクトラキエーション技術を利用して開発されたフルオレシニンと組み合わせ、分光データと画像情報を同時に使用することにより、網膜血管の異なる部分を分類することができ、したがって、医師が多くの糖尿病患者を遠隔性のもとで非遠隔性のもとに分類することを可能にする臨床手段となる。

網膜への薬液供給は脈絡膜および網膜血管の双方によって提供される。脈絡膜は無大動脈の外網膜中の光受容体への薬液源であり、網膜血管は内網膜中の中皮要素および神経線維への薬液供給を維持する上で重要な役割を果たす。網膜の高い薬液要求により、糖尿病性網膜症、高血圧、糖尿病性腎症、および血管閉塞性疾患において観察されるような循環変化は機能障害および広範囲網膜組織損傷を招く。

ヒックハム等 [Hickham et al (1963), Circulation 27, 375] により、網膜中の薬液供給の非侵襲的な測定が初めて提案されたが、これは光学ディスプレイを適切な網膜管に対して2度長写真法 (560および640nm) を使用するものである。より進んだ方法はBeltroni (1968), Applied Optics 27, 1113-1125に提案されたセプトペン (P1



tema) およびデュリソフ (Dulins) の3装置に基づくものである。

スベクトラキエーゾンスケムは、自らが供給する分光情報に基づき、照度計におけるヘモグロビンの吸収レベルの外推的測定を可能にするだけでなく、自らが提供される画像情報のため、網膜血管の検出およびデュリソフに用いることができる。ニューラルネットワークアルゴリズムの主要成分と組み合わせれば、異なった網膜段階の分類や糖尿病等の治療分類にも使用することができ、

生体組織における多くの化学物質は音および光の機能に關係する。したがって、たとえば網膜血管の主要成分が、オキシ-およびデオキシ-形状のヘモグロビン濃度を通して測定可能な酸素であったとしても、また、 $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADH}$ 、フラビン、チトクロム等、他の構成成分の濃度を測定することによっても重要な情報を得ることができ、必要かつ特定の測定で利用可能な時間およびコンピュータ資源の量と得ることのできる情報量、感度、信頼性および特異性とは相殺關係にある。

従来技術の多くが、このような組織の化学成分の分光検出を、反射における吸収ピーク、および何れもしくは青色光における蛍光ピークを単独または多数異同度でそれらの濃度に相關させるものとして記載していることを考えれば、本発明の方法と組み合わせるスベクトラキエーゾンスケムは、このような成分の1つ以上の濃度を同時にマッピングするために使用することができ、スベクトラキエーゾンスケムが動作させる特定のハードウェアによって、得られる情報の型および量決定されるであろう。

例えば、最も単純かつ最も直接的な構成は、スベクトラキエーゾを基底部カメラのCDポートに取り付けて照度計が画像されるようにすると同時に、基底部カメラの同じ広帯域白色光源を用いて網膜からの反射光を測定するものである。この場合、酸素濃度はデュリ (Dulac) (1989) *J. Appl. Optics* Vol. 27, 1113, 1988、および *J. Appl. Optics* Vol. 28, 1061, および *Dulac et al.* (1980) *Vision Research* Vol. 20, 1099。また、同様に、画像された画像の全ピクセルに拡張することができ、スベクトラキエーゾに基づいたより複雑なシステムは (1) 自然蛍光分光画像、(2) UVもしくは青色光当量照度ランプを用いる分光画像、(3) 単一で、連続して、もしくは順に、波長650, 442, 378, 337, 325, 400, 448, 308, 378, 370, 355, および他の間接な情報を与える同等な波長のいずれかにあるレーザ照度計を用いる分光画像である。

これらの構成はいくつかの形式で構築することが可能であり、独立していてもよく、また、同一の装置でいかなる数の組み合わせに結合してもよい。装置は光源(複数でもよい)、基底部カメラおよびスベクトラキエーゾからなり、データを解析し、眼科医に有用なように

表示するためのコンピュータおよびソフトウェアを含む。

白色光反射、自然蛍光、単波長照度計レーザ照度計光、もしくは多波長レーザ照度計光の場合、サンプリング照明され、分光画像が測定される。

ハルズレーザ (複数でもよい) 照明の場合、スベクトラキエーゾの実施方法は若干変形され、いくつかの基本的でも実質的でもないが複雑な作動に重要なハードウェア変更を必要とする、これは以下の通りである。

単一ハルズレーザ照度計分光画像の場合、レーザハルスとスベクトラキエーゾのCDのフレイム取り込みとを干渉計の垂直角度と同期させ、各ハルスにおいて干渉計がスキャナを行い、新たなフレイムがコンピュータによって収集されるようにする (一般に数ハルスを各フレイムのために使用することもできるが、この数はフレイム毎に変化しないようにする)。こうして、各の順において、インテグレーションが所定の (異なる) 数のレーザハルスに对应する、これは、各フレイムを同一の照明強度で取り込むことを確保するための必要であり、さもなければ、各フレイムは異なる数のレーザハルスに由来する蛍光を測定することになり、インテグレーションは歪む。

数ハルスのレーザに誘致された蛍光分光画像の場合、実施方法は2つの手法で行うことができる。すなわち (1) 上述のように順に各フレイムについて全分光立方体を収集すること; これは、測定中に1つのフレイムが活性化され、最後には各フレイムが変量について1つの測定された分光立方体が存在するようにすることを意味する、と (2) 各フレイムを順に干渉計およびフレイム取り込みと同期させてハルス化し、すべてのレーザが順に次の干渉計スキャナおよびCDのフレイムの取り込みの前に切り替えられるようにし、最後には1つの分光立方体のみが測定されるようにすることである。

最後には当然、すべての情報を分析および解析しななければならない。最も重要なアルゴリズムは、画像の異なる波長間および異なるピクセル間で得られる強度を比較するものとなる。これらのアルゴリズムは強度の変形、および組織中の異なる領域間および異なる波長間の比を考慮すべきである。この方法は極めて感度が高く、また、大きな定量的情報を提供するのであるため、スリットランプ画像 (白色光もしくは透過光) の代わりとなり得る。

他の用途は当業者に明らかである。これらには網膜血管、急性区分別解性血管、慢性区分別解性、角膜炎および紅斑性眼等による視覚喪失、および現在白色光や由来の異なる蛍光を用いた検査法で分析されている多くの他のものがある。

実施例7  
眼、膀胱、肺、頸部および他の器官における生体内での悪性組織のマッピング

スベクトラキエーゾンスケムは内視鏡および腫瘍検査をあらゆる組織光学要素に取り付け可能であるため、手術前、中、もしくは後において外科医が切開の開始部位、停止部位を決定したり、病理組織が手術において除去されたかどうかを判断する助けになり得る。スベクトラキエーゾンスケムは本質的に組織の性質を、その分光特性に關係した化学組成を通して分析し、使用者が把握、判断および行動を行うための視覚マッピング (通常強調されたもの) を提供するのに本質的に適している。

生体内で腫瘍組織を検出する場合、ハードウェア構成および関与する分析および表示アルゴリズムの双方は上述の眼科の実施例 (実施例6参照) に類似している。違いは腫光光学要素 (基底部カメラに代わる異なる型の内視鏡)、検出に關わるいくつかの基本的分子成分の型であり、これらはいくつかは、酸素濃度のようにおそろしく共通であり、他の付加的なものにはコラーゲンおよびエラスチン、DNAクロマチンのような細胞核内の遺伝子物質等である。多波長もしくはハルス化照度計の場合における照明および同期の要求も同様である [Pittis et al., *Paper presented at European Biomedical Optics Week* 9 Sept. 1996年9月12-16日, Barcelona Spain]。

実施例8  
主要コンポーネント解析を用いた細胞および組織分類による診断病理学の補助  
今日、細胞および組織の顕微鏡検査に基づいて診断および手術の決定が多くなされている。検査員は、血液、腫瘍および腎管スミアおよび尿サンプリングのような細胞スミアもしくは染色およびもしくは染色された組織に基づいて決定を行う。典型例として広く知られたPapスミアが、これはペピロー (Papilloma) グラムス顕微鏡を検査するため、多数の腎管スミアについてなされる。

解析は病理学者により行われるが、病理学者は長年にわたって顕微鏡を通して観察し、細胞の形状、色、核および細胞質の相対サイズ、増殖する細胞およびその他の空間的な特徴などに基づいて、細胞の観察および分類を要請し、学んでいる。病理学者はまた、スミアに見られる癌細胞質および人工物を無視することを学んでいる。このような検査はしかしながらたんに主観によるところが多く、毎日行われるべき検査があまりに多いため、しばしば技術者が予備選別を行って、深い検査を必要とする疑いのある細胞もしくは組織のみを病理学者に提供している。但し、予備選別は人間のミスもしくは疲労などによりある程度信頼性に欠ける可能性がある。

病理学分野においては、このようなシステムの信頼性および信頼性をもっと向上させるとともに自動的にすべきであるという必要性が広く認識されている。今日、病理学者は最終診断を行う必要があるが、将来において選別および診断が自動的に行えるようになることは確信できるのではない。

賢い変換および表示アルゴリズムを有したSpectralCubeソフトウェアは、病理診断の全システムにおいて、選別において用いることができ、病理学者による診断における客観性及び信頼性の向上の助けとなり、いずれは完全な自動診断の助けとなりえる。

病気に犯された細胞は、病気の種類および段階に応じて化学的に大きく変化することが良く知られている。その結果、これらの変化は、分光分析データ、着色細胞もしくは組織の透過度、自己蛍光、追跡フローの蛍光もしくは顕微鏡観察における反射コントラストとして現れる。分光分析と画像と組み合わせるSpectralCubeソフトウェアは、これら全てのモード順列に用いることができ、これらの特性を検出するとともに定量的な処理を行うための非常に優れた装置であり、適切な数学的処理を行うことにより、病理学者もしくは外科医に診断決定のための測定結果を提示することができる。

表示および変換のために用いられるアルゴリズムは上述のいずれもの、例えば、異なるサイズについての類似マッピングおよび分類法、主要コンポーネント解析法、神経ネットワーク法、その他の当業者にとって明らかな方法である。

図28-図30には、診断病理学の分野での本発明を用いる方法を示している。図28は、ハバニクスラス (すなわち、Papスミア) 用に通常的に用いられる腎管スミア assayatory-focus 着色細胞について、本発明の方法を用いて得られた透過顕微鏡のイメージを示す。イメージ (画像) の中央の細胞 (Aマーカー部であり、細胞の核を示す) がHPV (human Papilloma virus) 細胞 (すなわち、癌性の腎管細胞) であり、一対、イメージの右下部細胞 (Bマーカー部であり、細胞の細胞質を示す) が正常腎管細胞である。符号AおよびBは多形核細胞 (すなわち、好中球) を示し、核細胞の核をB符号で示し、癌性細胞の細胞質をそれぞれ示す。これらの細胞は白黒イメージで示されている (但し、オリジナルはカラーである) ため、若干不鮮明であるが、これらの境界は手作業で付けられた人工的な線で見分けられている。

得られたスベクトラキエーゾは上述の主要コンポーネント解析が行われる。この目的のため、全スベクトルレンジ (450nm-800nm) が200の狭い波長レンジに分割される。すなわち、 $N=20$ であり、ここでは、各波長レンジのそれぞれにおける各ピクセルの強度に基づいて200の白黒イメージとして参照する。言い換えれば、200の所定主要コンポーネントが存在する。これらの200イメージは、上述の行列 (マトリクス) Bの列を形成するために用いられる。行列BおよびC、さらに行列Cの固有ベクトル $y_i$ および固有値 $\lambda_i$ が上述のようにして計算される。図29において、固有値 $\lambda_i$ が、200の異なる主要コンポーネント、すなわち、波長レンジ ( $i=1, \dots, 20$ ) の関数としてプロットされる。図30は、ピクセル強度としてベクトル $y_i$ の値を用いて得られた白黒強度イメージを



示し、これは白黒カメラを通して観測されるオリジナルイメージ、図28のように白黒イメージとして表示されたイメージと非常に良く似ている。しかしながら、図から分かるように、サンゾルに固有の重要なスベクトル情報を有しておらず、サンゾルを通過した光に影響され、顕微鏡レンズのスベクトルを主として有する。一方、図30b、30cに示されるように、多くの固有ベクトル、例えば、 $BP_{0.1}$ および $BP_{0.2}$ を用いて同様に表示された強度イメージは新たな効果を示す。癌性細胞（図28のA）の増殖のまわりのセルおよび癌性細胞のみが他の部分より高い強度（図30b、30cにおける白色ゾーン）を示し、一方、正常細胞（図28のB）は他のイメージ部分より低い強度（図30b、30cにおける暗色ゾーン）を示す。このため、図29に示されるように検査イメージにおいて存在値が非常に低い主要コンポーネント10および13に依存する物質もしくは構造は、それがなんであれ、癌性細胞に特有であり、正常細胞の下で検出されるということを精確付けることができる。このため、あるタイプの細胞もしくは細胞の一部のみが行列Bおよび固有値1とともに構成される一つもしくは複数のイメージを示すという事実を、本発明の方法により測定されるときに各タイプを分類するために用いることができる。

またもと、先の米国特許出願第08/392,019号に、二次元CCDセンサおよび電子機器を組み合わせて得られる特に高感度の干渉法に基づくユニークな分光画像システムが述べられており、これによれば、空間的に連続した方法で何百何千ものスベクトルを同時に特定しコンピュータに記憶することができ、本発明は、これらの機器（ハードウェア）が生物研究、医学治療および診断にどのように用いることができるかを説明する。ここに提案される方法における分光分析と撮像との組み合わせ方法は新たな分野を開くものであり、これを分光生物撮像と称する。

本発明が扱っている点は、分光測定および測定データをサンゾルの全ての点（すなわち、ピクセル）において独立して且つ同時に収集できるので、サンゾル位置を固定として物質および分子タイプおよびその集中度に関する情報を提供でき（これにより物質の存在および集中度をサンゾル化できる）、さらに、これと同時に従来の撮像法も同時に得ることができる（これにより従来の形態学的解析（例えば、米国特許第4,985,725号参照）も可能となる）。このため、本発明は、光透過、反射、散乱および蛍光法を用いて高い空間およびスベクトル分解度で、細胞および組織成分、構造、器官、遺伝物質、致光増殖因子の存在検出および定量検査や、細胞および組織内での致光薬物の分配測定を行うことができる。

本発明のさらなる効果は、分光分析データの交換が非常に単純であることである。本発明に係るデータは位置に集められるのではなく、撮像面から集められ、い

くつかの波長ではなく多数の波長に対して集められるという事実から、本発明は、（1）例えば、同一の患者の癌性および非癌性組織表面を比較するので、各患者の組織を比較する場合は異なる、着色効果を自動的に除去することができる、（2）異なる波長での強度の比較を行うことができるので、求める特性からは独立したスベクトル効果を自動的に除去することができる、（3）一旦、システムソフトウェアが適切な特性強調（例えば、人工色もしくは他の手段の使用）を行ったり、適切なディスプレイ（例えば、コンピュータの画面もしくはビデオ画面）上に強調イメージを表示したりすると、イメージにおける求める特性およびその効果を容易に視覚化してユーザに示すことができる。

本発明のさらなる効果は、フィルム、格子およびその他の分散技術による周知のFolgettもしくは多重効果フーリエ変換分光分析であり、これはスベクトル測定において高いS/N比を示す。但し、ノイズレベルが信号から独立している（背景もしくはシステム限定動作）時、およびノイズが信号の平方根に比例し（フォトンノイズ制限）且つ信号が全スベクトルレンジでの平均信号より高い場合である。

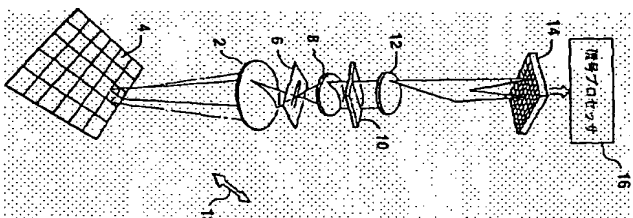
本発明のさらなる効果は、先の米国特許出願第08/392,019号に詳細が開示されている空間的な光学形状により、そのシステムコンセンサおよびシステムハードウェアそのものを撮像すべきどのようなサンゾル表面にも用いることができ、現存するもしくは将来開発されるどのような撮像光学系にも用いることができるということである。

本発明の重要な点はまた、計測データを意味ある方法で変換し表示するためにコンピュータソフトウェアとして用いられる数多くの数学的アルゴリズムである。同一の機器（主として研究分野のユーザ用であり、様々な作業が可能となる）において、もしくは別の機器（業務家用であり、特化された迅速な作業が可能となる）において、さらに、種々の用途に応じて要求される多様性の組み合わせおよびレベルにおいて、多くのタイプのアルゴリズムを用いることができるのは明らかである。このアルゴリズムは（現在および将来、この技術分野で知られている）スベクトル情報の変換に基づくものとする

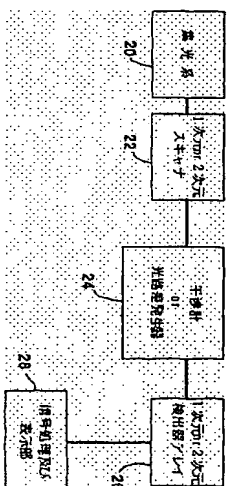
ことができる。このようなものとしては、特定の化学エレメントもしくは分子のスベクトル吸収もしくは蛍光ピークがあり、このような化学物質の集中度マップ、もしくはは濃度に形変換に用いられる。このとき、イメージ形状および現在および将来のイメージ処理アルゴリズム、もしくはスベクトルおよび撮像情報の組み合わせが用いられ、このようなものとしては、例えば、主要コンポーネント解析、算術演算、背景除去もしくは異なるタイプの分類分けによる全ピクセルのスベクトル間の比較、異なるピクセルもしくは空間範囲間の比較、および異なる波長もしくは空間範囲での比較がある。

当業者によれば、上述の撮像システムもしくはは撮像分光分析システムに付属のものを用いて、もしくはは将来出現する撮像装置を用いて、上記のものと類似もしくは異なる多量の用途を見いだすことができるのは明らかである。

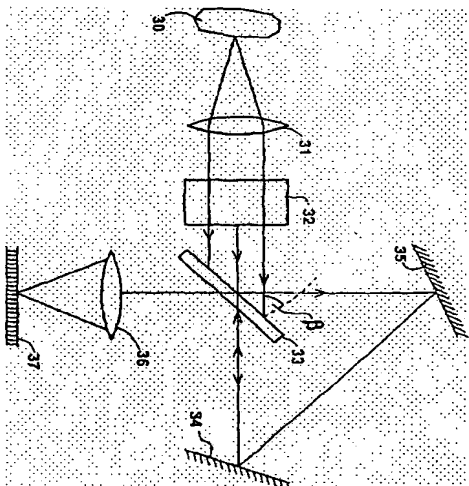
【第1図】



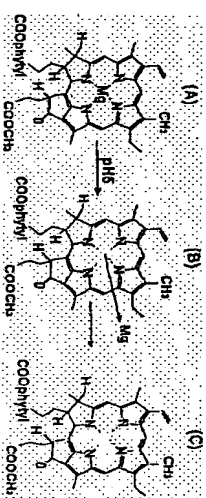
【第2図】



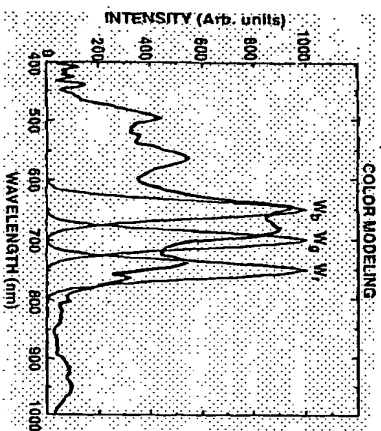
【第3図】



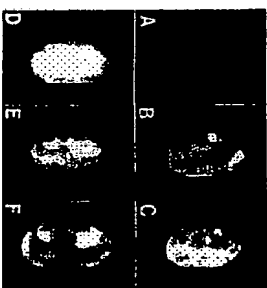
【第5図】



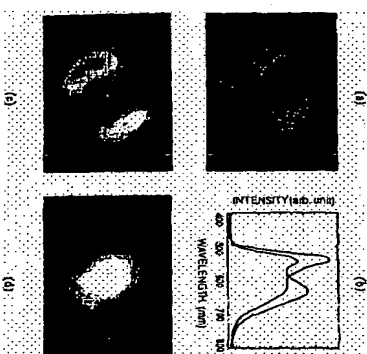
【第4図】



【第12図】



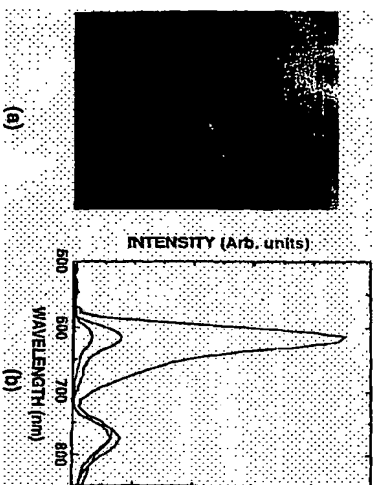
【第6図】



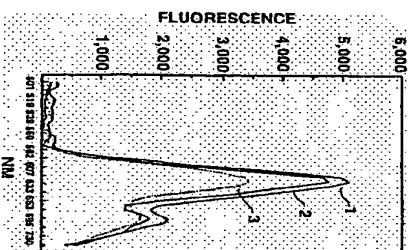
【第14図】



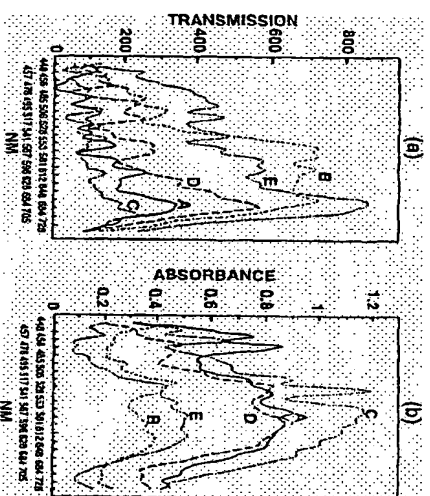
【第5図】



【第13図】



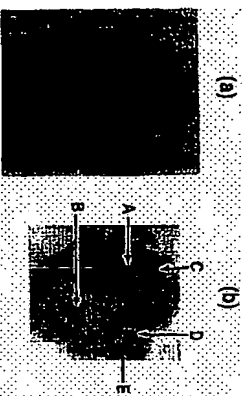
【第9図】



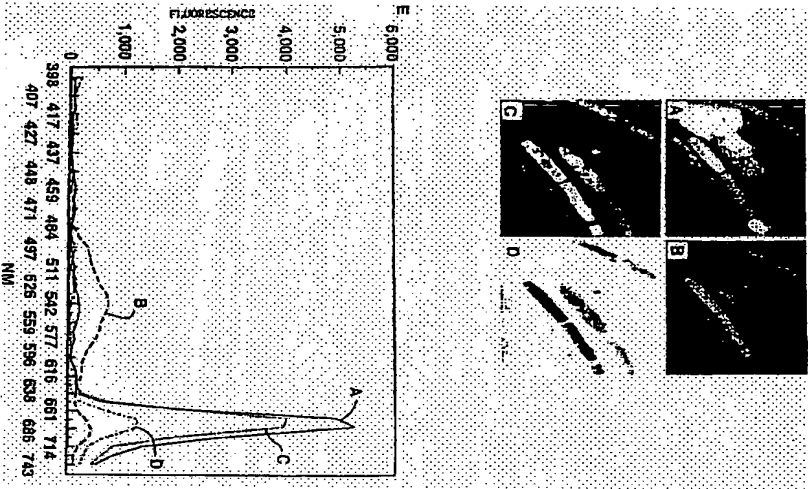
【第25図】



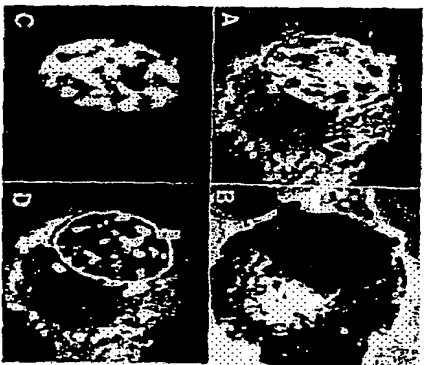
【第8図】



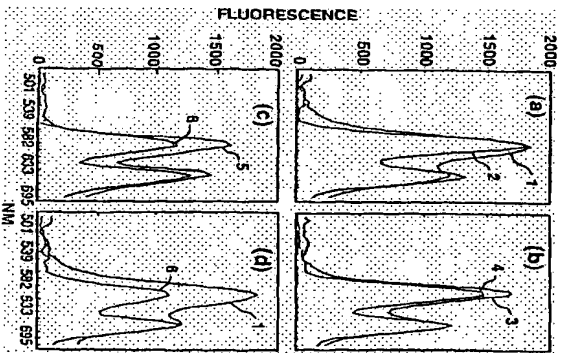
【第7図】



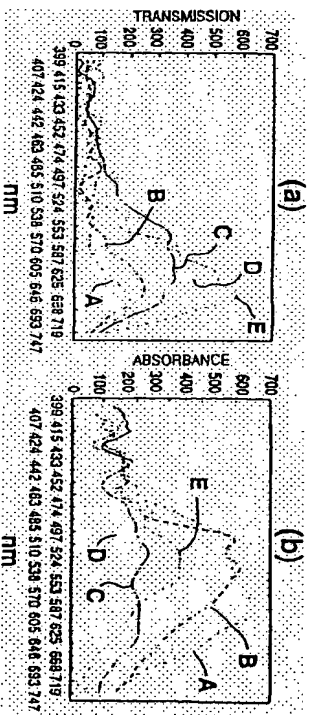
【第10図】



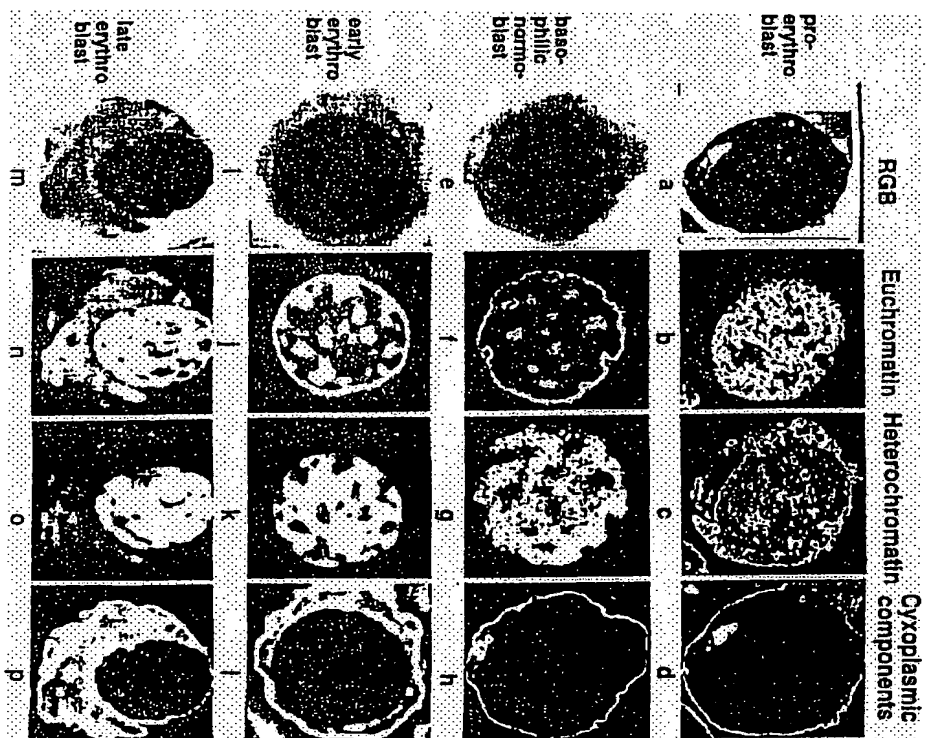
【第11図】



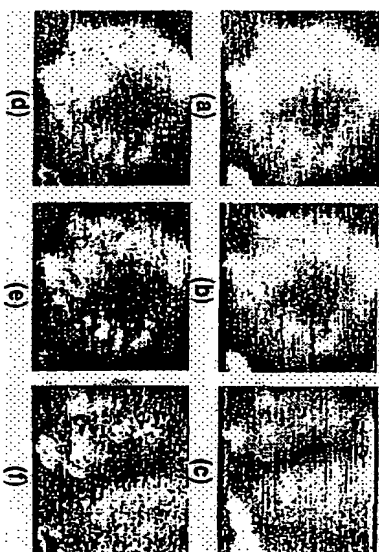
【第16図】



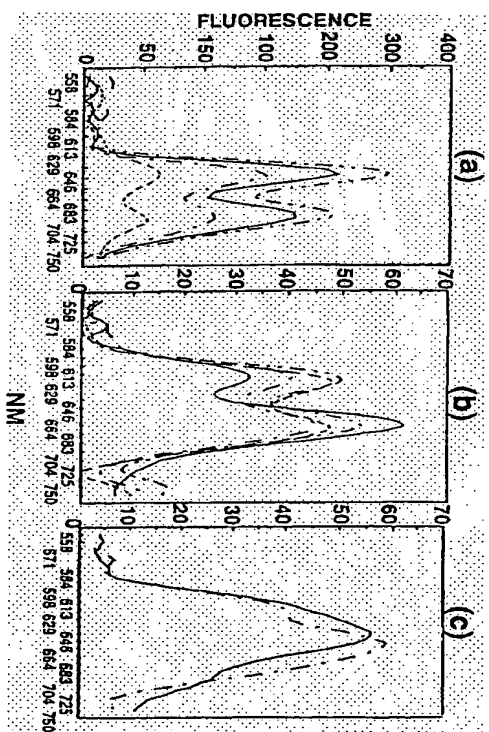
【第17図】



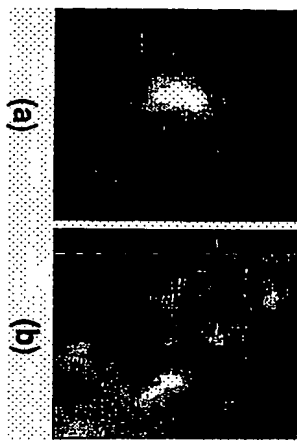
【第18図】



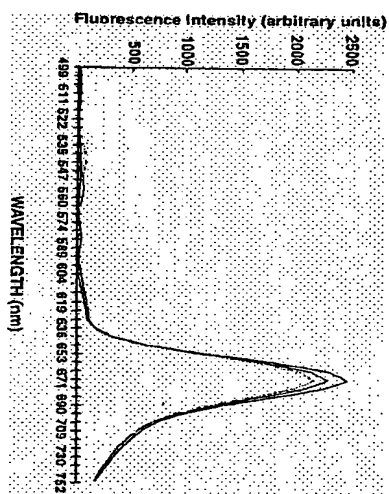
【第19図】



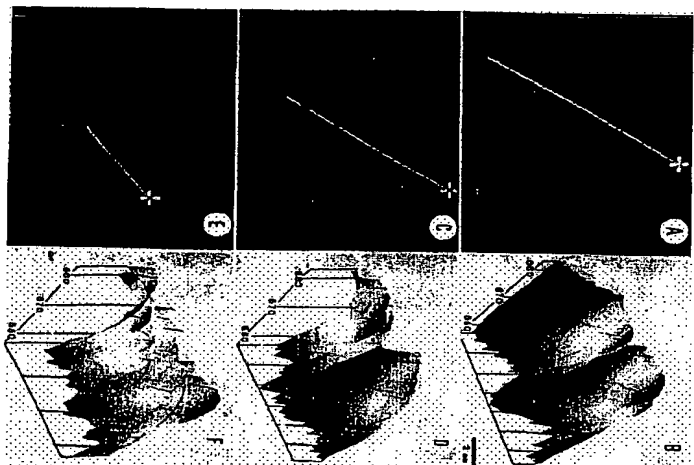
【第20図】



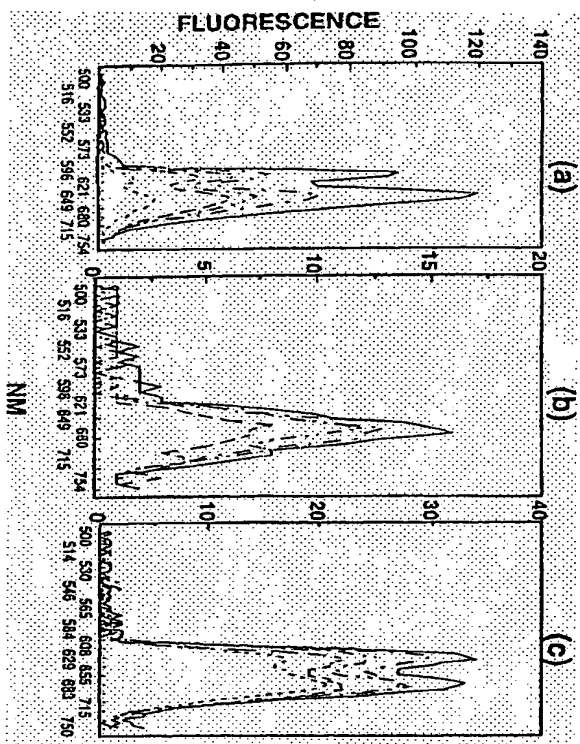
【第22図】



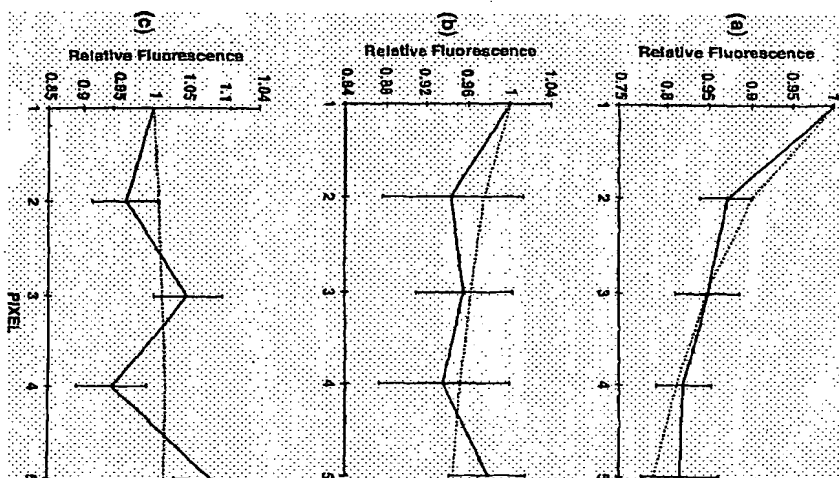
【第23図】



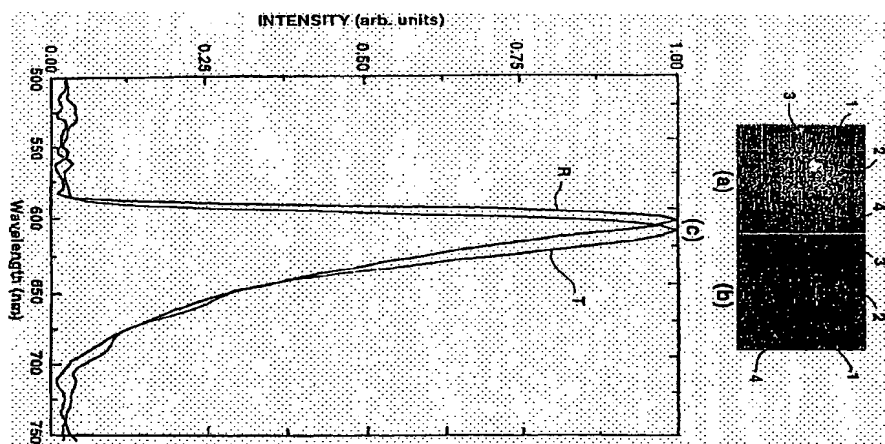
【第21図】



【第24図】



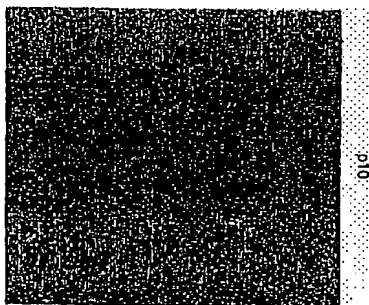
【第26図】



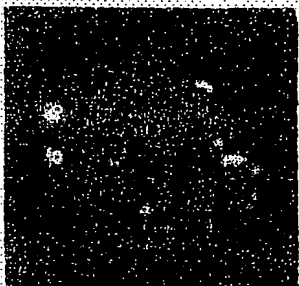
【第30a図】



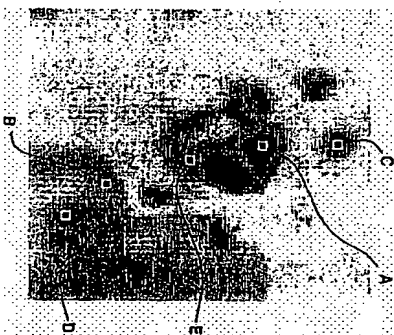
【第30b図】



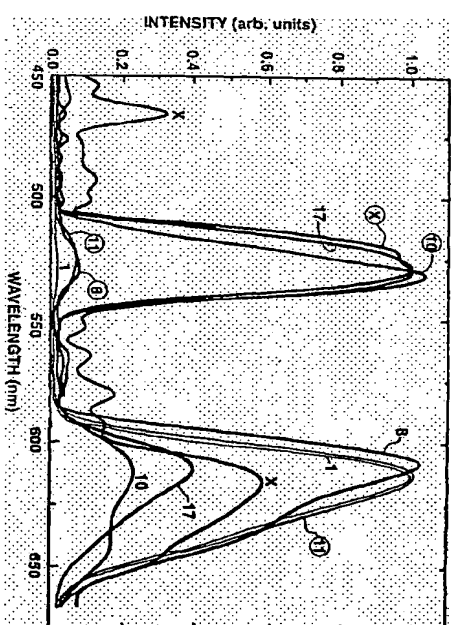
【第27図】



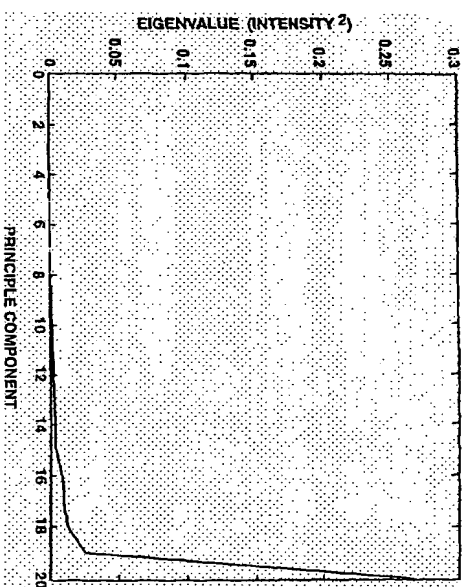
【第28図】



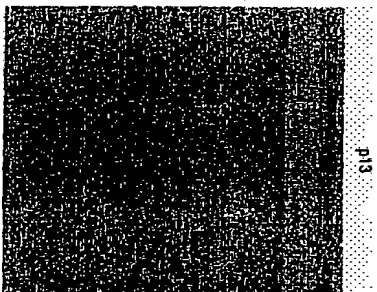
【第27c図】



【第29図】



【第30c図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
G01B 11/00  
G01J 3/443

識別記号

F I  
G01J 3/443  
G01N 21/27

E



G01N	21/27	21/64	E
	21/64	33/48	P
	33/48	33/483	C
G02B	21/36	G02B 21/36	
		A61B 3/12	E
(72)発明者	ダーク ジー ソエングゼン アメリカ合衆国、カリフォルニア 92008、カールスバッド、チエシヤイア 3638	(56)参考文献	特開 平4-339225 (J P, A) 特開 平7-301562 (J P, A) 特開 昭61-88116 (J P, A) 特開 平1-112122 (J P, A) 特開 平7-244239 (J P, A) 特開 平5-126746 (J P, A) 特開 平7-10814 (J P, A) 特開 平5-236834 (J P, A) 特開 平6-300884 (J P, A) 特開 平7-174631 (J P, A) 特開 平7-209187 (J P, A) 特表 平5-503367 (J P, A) 特表 平11-503239 (J P, A) 米国特許4976542 (U S, A) 米国特許5539517 (U S, A) 国際公開95/18236 (WO, A1) 国際公開95/20148 (WO, A1)
(72)発明者	タリオ カビナ イスラエル国、ティムラート 23840、 ハボルシエ 7	10	
(72)発明者	ロバート エー バックワルド イスラエル国、ラヤト イシヤイ 30095、ハダダストリート	15	
(72)発明者	ジビ ヴリツク イスラエル国、クアター ハロエ 38955、	20	
		25	
	(58)調査した分野(Int.Cl. 1, DB名)		
	G01N 21/62 - 21/74		
	G01N 21/06 - 21/01		
	G01N 21/17 - 21/61		
	G01N 33/48 - 33/50		
	G01J 3/06 - 3/52		
	EPAT (QUESTEL)		
	JICSTライル(JOIS)		
	WPI/L (QUESTEL)		
	実用ライル(PATOLIS)		
	特許ライル(PATOLIS)		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**